

**UNTERSUCHUNGEN
ZUR PROTEINBIOSYNTHESE
MIT EINEM ZELLFREIEN SYSTEM
AUS SACCHAROMYCES**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt dem

Fachbereich Biologie

der Freien Universität Berlin

von

KARIN UTTECH

aus Berlin

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553616_0048

**UNTERSUCHUNGEN
ZUR PROTEINBIOSYNTHESE
MIT EINEM ZELLFREIEN SYSTEM
AUS SACCHAROMYCES**

INAUGURAL—DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt dem

Fachbereich Biologie

der Freien Universität Berlin

von

KARIN UTTECH

aus Berlin



1. Referent: Prof. Dr. E.-R. Lochmann
2. Referent: Prof. Dr. M. Schweiger

Tag der mündlichen Prüfung: 28. Februar 1972

Tag der Promotion:

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>EINLEITUNG</u>	1
1.1 <u>Transkription</u>	2
1.2 <u>Translation</u>	2
1.2.1 Die Proteinsynthese bei Procaryoten	3
Initiation	
Elongation	
Termination	
1.2.2 Die Proteinsynthese bei Eucaryoten	9
1.3 <u>Zellfreie Systeme</u>	10
1.4 <u>Problemstellung</u>	11
2. <u>MATERIAL</u>	13
3. <u>AUFBAU DES SYSTEMS</u>	16
3.1 <u>Übersicht</u>	16
3.2 <u>Anzucht und Ernte der Hefen</u>	17
3.2.1 Der Einfluß der Wachstumsphase auf die Proteinsynthese in vitro	18
3.2.2 Anzucht der Hefen	20
3.3 <u>Aufschließen der Hefezellen</u>	20
3.4 <u>Aufarbeitung des Homogenisats</u>	23
3.4.1 S 30-Fraktion	23
3.4.2 Ribosomen und Überstandsenzyme	24
3.4.3 Behandlung der Enzymfraktion	25
3.4.3.1 Gelfiltration und Analyse	25
3.4.3.2 Fraktionierung an DEAE- Cellulose	27
3.4.3.3 Dialyse	30
3.4.3.4 Zusammenfassung	30

	Seite
3.4.4 Behandlung der Ribosomen	31
3.4.4.1 Dichtegradienten-Zentrifugation	32
3.4.4.2 Waschen mit verschiedenen TMA-Puffern	36
3.4.4.3 Waschen mit Puffern hoher NH_4Cl -Konzentration	37
3.4.4.4 RNase-Behandlung	39
3.4.4.5 Präinkubation mit energieliefernden Substanzen	40
3.4.4.6 Dissoziation in Untereinheiten	41
3.4.4.6.1 EDTA-Behandlung	41
3.4.4.6.2 Dialyse gegen Puffer niedriger Mg^{++} -Konzentration	44
3.4.4.6.3 Behandlung mit KCl-haltigen Puffern	47
3.4.4.7 Einstellung der Ribosomenkonzentration	50
3.4.4.8 Zusammenfassung	51
3.5 <u>Haltbarkeit der zellfreien Fraktionen</u>	51
3.6 <u>Übersicht eines Verfahrens zur Gewinnung zellfreier Fraktionen</u>	55
3.7 <u>Inkubationsbedingungen</u>	56
3.7.1 Bereitung des Inkubationsansatzes	56
3.7.2 Inkubationszeit und -temperatur	56
3.7.3 Unterbrechen der Proteinsynthese und Waschen des Niederschlages	57
3.7.4 Messung und Auswertung der Radioaktivität	58
3.7.5 pH-Wert	59
3.7.6 Magnesium-Konzentration	60
3.7.7 Ribosomen-Konzentration	61
3.7.8 Konzentration der Überstandsenzyme	63
3.7.9 Poly U-Konzentration	65
3.7.10 tRNS-Konzentration	66

	Seite
3.7.11 Energielieferndes System	67
3.7.12 Radioaktive Aminosäure	67
3.7.13 Zusammenfassung der Inkubations- bedingungen	68
4. <u>VERSUCHE ZUR FUNKTION DES ZELLFREIEN SYSTEMS</u>	69
4.1 <u>Die Leistung des zellfreien Systems</u>	69
4.1.1 Das Poly C- und Poly A-abhängige System	69
4.1.2 Das Poly U-abhängige System	69
4.1.2.1 Essentielle Faktoren und Inhibitoren	69
Diskussion des Poly U- abhängigen Systems	69
4.1.2.2 Zeitlicher Ablauf der Proteinsynthese	75
4.1.2.3 Aminoacylierung der tRNS	76
4.1.3 Das DNS-abhängige System	78
Diskussion des DNS-abhängigen Systems	
4.2 <u>Die Hemmung des zellfreien Systems durch Röntgenbestrahlung</u>	87
4.2.1 Methode	87
4.2.2 Bestrahlung der Ribosomen	88
4.2.3 Bestrahlung der Enzymfraktion	93
4.2.4 Bestrahlung von Poly U	99
4.2.5 Diskussion der durch Röntgenbestrah- lung hervorgerufenen Inaktivierung des zellfreien Systems	101
4.3 <u>Mikrokalorimetrische Untersuchungen</u>	102
4.3.1 Methode	102
4.3.2 Ergebnisse	103

	Seite
5. <u>DISKUSSION</u>	107
5.1 <u>Vergleich verschiedener Protein synthetisierender in vitro-Systeme</u>	107
5.2 <u>Röntgenbestrahlung</u>	111
5.3 <u>Mikrokalorimetrie</u>	113
6. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	114
7. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	117
<u>Anhang</u>	129

1. EINLEITUNG

Seit Aufklärung der chemischen Natur der Erbsubstanz als Desoxyribonucleinsäure (DNS) durch AVERY und Mitarbeiter (9) und der aus histochemischen Befunden von CASPERSSON (34) und BRACHET (22) aufgestellten Hypothese, daß die Proteinsynthese in der Zelle an die Gegenwart von Ribonucleinsäure (RNS) gebunden sei, hat eine stürmische Entwicklung in der Erforschung molekularbiologischer Prozesse eingesetzt.

Die Strukturbestimmung des DNS-Moleküls durch WATSON und CRICK (208,209) eröffnete die Möglichkeit zum Verständnis sowohl für die Transkription - Umkopieren des genetischen Codes (Nucleotidtriplettsequenzen) von der DNS auf RNS - als auch für die Translation - Übersetzen des Codes der messenger-RNS (mRNS) in die Aminosäuresequenz der Proteine d.h. die eigentliche Proteinsynthese.

Die Anwendung von zellfreien Systemen hat zusammen mit genetischen Untersuchungen im Verlauf der letzten Jahre entscheidend zu den Kenntnissen über den genetischen Code und den Mechanismus der Proteinbiosynthese beigetragen. Nachdem geklärt war, daß die Informationsübertragung von DNS auf Proteine an mRNS gebunden ist (JACOB u. MONOD (101), NOMURA et al. (152), GROS et al. (83)) und JACOB und MONOD für die Regulation der mRNS-Synthese das nach ihnen benannte Modell aufgestellt hatten (101), war die Arbeit von NIRENBERG und MATTHAEI (144) richtungsweisend für weitere Versuche mit Systemen in vitro: Synthetische Polynucleotide, die in diesen Systemen Messenger-Funktion übernehmen können, gestatten die Entschlüsselung des genetischen Codes (NIRENBERG et al. (145,146), OCHOA (154)).

Untersuchungen an verschiedenen Organismen beweisen die Universalität des genetischen Codes und Mutationsexperimente die Colinearität zwischen DNS, mRNS und Protein (YANOFSKY (223)). Die heutigen Erkenntnisse über den Mechanismus der Proteinsynthese basieren überwiegend auf Arbeiten

mit *Escherichia coli* - ein Modell wurde schon 1963 von GILBERT (72,73) und WATSON (210) aufgestellt - und sind auf Grund neuerer Untersuchungen im wesentlichen auf Eucaryoten übertragbar.

1.1 Transkription

Alle in der Zelle vorkommenden RNS-Arten (ribosomale RNS = rRNS, transfer RNS = tRNS, messenger RNS = mRNS) werden an der DNS aus den 4 Ribonucleotidtriphosphaten Adenosintriphosphat, Guanosintriphosphat, Cytidintriphosphat und Uridintriphosphat mit Hilfe eines als DNS-abhängige-RNS-Polymerase (67) bezeichneten Enzyms synthetisiert. Im Gegensatz zur DNS-Replikation wird jedoch nur einer der beiden DNS-Stränge - der codogene Strang - als Matrizze benutzt. In einigen Fällen kann die Information abschnittsweise auf beiden Strängen abgelesen werden. Die Neubildung der RNS erfolgt vom 5'-P-Ende, das meist mit Adenin oder Guanin beginnt, in Richtung zum terminalen 3'-OH-Ende (6) mit einer Geschwindigkeit von 55 Nucleotiden/sec (23). Die mRNS wird vom Kern nicht in freier Form in das Cytoplasma entlassen sondern als mRNS-Protein-Komplex - den von SPIRIN entdeckten Informosomen (189), die offenbar auch während der Translation erhalten bleiben (164).

1.2 Translation

Die Orte der Proteinsynthese sind die im Cytoplasma lokalisierten Ribosomen (95), die sich wahrscheinlich bereits an der Kernmembran mit mRNS zu Polysomen formieren und gebunden an endoplasmatisches Retikulum oder auch frei vorkommen. Die Information ist auf der mRNS in Form von 64 möglichen Nucleotidtripletts gespeichert, von denen jedes (mit Ausnahme der Codone UAA, UAG und UGA) eine Aminosäure codiert. Nach der von CRICK (44) aufgestellten und später bestätigten Adaptorhypothese wird jede Aminosäure an eine für sie spezifische tRNS gebunden. Die dazu notwendige Aktivierung der Amino-

säure durch ATP (93) und die esterartige Bindung der Aminosäure über die Carboxylgruppe mit dem 3'-OH-Ende des terminalen Adenosins der tRNS (225) erfolgt durch die spezifische Aminoacyl-tRNS-Synthetase (15,94). In Form dieses Aminoacyl-tRNS-Komplexes wird jede Aminosäure als Folge der Codon(mRNS)-Anticodon(tRNS)-Paarung an den richtigen Reaktionsort auf dem Ribosom transferiert.

Wie aus dieser mRNS-tRNS-Bindung als auch aus der Degeneration des genetischen Codes (eine Aminosäure kann durch mehrere Codons determiniert werden) zu erwarten ist, existiert für jedes Codewort eine spezifische tRNS, so daß auf eine Aminosäure mehrere tRNS-Arten kommen können (45,217). Der Befund, daß sich im allgemeinen die jeweils eine Aminosäure codierenden Tripletts lediglich in der letzten Base unterscheiden, führte CRICK (46) zu der sog. Wobble-Hypothese.

Die Ableserichtung der mRNS erfolgt entsprechend ihrer Synthese vom 5'- zum 3'-Ende, wobei die Synthese der Proteine vom Amino- zum Carboxyl-Ende (18,50) fortschreitet. Die Reaktionsschritte der Proteinsynthese lassen sich in 3 Phasen unterteilen:

Initiation, Elongation und Termination.

Im folgenden soll zunächst auf den Mechanismus bei Prokaryoten eingegangen und danach Unterschiede bei Eucaryoten herausgestellt werden.

1.2.1 Die Proteinsynthese bei Prokaryoten

Initiation

Die Ribosomen der Bakterien gehören dem 70 S-Typ* an und setzen sich aus definierten Untereinheiten zusammen (30 S, 50 S) (197). Die kleine 30 S-Untereinheit bildet zusammen mit mRNS und einer besonderen tRNS - der zuerst in Extrakten aus Escherichia coli entdeckten N-Formylmethionyl-tRNS

*) S = Sedimentationskonstante in Svedberg-Einheiten (192)

(FMet-tRNS_{FMet}) (127) - den sogenannten Initiationskomplex (153,179), der den Start der Proteinsynthese einleitet. Neben dieser tRNS_{FMet}, die nach Beladen mit Methionin (Met) durch eine Transformylase (48,203) auf Kosten von N¹⁰-Formyltetrahydrofolsäure zu FMet-tRNS_{FMet} formyliert wird, gibt es eine nicht formylierbare Met-tRNS_{Met}. Beide tRNS-Arten werden durch AUG determiniert, allerdings mit dem Unterschied, daß tRNS_{Met} nur proteinketten-internes Met anliefert, während tRNS_{FMet} an AUG als auch GUG bindet, wenn sich diese als Initiationstriplets am oder in der Nähe des 5'-Endes des Messengers befinden (39).

Die Bildung des Initiationskomplexes ist neben der Beteiligung von Initiationsfaktoren (F₁, F₂, F₃ bzw. A, B, C (171)) an die Gegenwart von GTP (5,118) gebunden. Über die Funktion des GTP werden verschiedene Auffassungen diskutiert. Einige Befunde sprechen für eine eher konfigurationsbedingte Wirkung (90,131), während nach anderen Berichten GTP in GDP und anorganisches Phosphat (P_i) gespalten wird (82). Die Faktoren F₁ und F₃ sind an der Bindung von mRNS an die 30 S-Untereinheit beteiligt (155,175), während F₂ (131) die Assoziation von FMet-tRNS_{FMet} an den mRNS-30 S-Ribosom-Komplex bewirkt. Dem Faktor F₁ wird ebenso eine Funktion an dieser Reaktion zugeschrieben (35). Alle 3 Faktoren sind ein Bestandteil des Ribosoms und lassen sich von diesem durch Behandlung mit NH₄Cl (F₁, F₂ durch 0,5 M NH₄Cl, F₃ durch 1,0 M NH₄Cl) (100) abwaschen.

Nach Fertigstellung des Initiationskomplexes wird die 50 S-Ribosomen-Untereinheit angelagert, worauf in einem komplizierten Prozeß, der mehrere Stufen durchläuft, die Verknüpfung der einzelnen Aminosäuren stattfindet (Elongation).

Elongation

Als Bindungsorte für mRNS und aminosäuretragende tRNS-Moleküle (Aminoacyl-tRNS = a-tRNS) werden bestimmte aktive Bereiche am Ribosom angenommen: Eingang (Acceptor- oder Aminoacylsite) und Ausgang (Donor- oder Peptidylsite). Daneben existieren wahrscheinlich noch eine "Einschleusungs-region" für a-tRNS-Moleküle und ein "Abwurfbereich" für freie tRNS und Peptidketten (205).

Die Acceptorsite der 30 S-Untereinheit nimmt zunächst das Initiationscodon und FMet-tRNS_{FMet} auf. In einem Translokationsschritt, bei dem die mRNS um eine Tripletteinheit auf dem Ribosom weiterbewegt wird, gelangt das Triplettsamen mit der anhängenden a-tRNS auf die Donorsite des Ribosoms. Damit ist die Acceptorsite für den Eintritt der nächsten a-tRNS freigegeben.

In einem nun erfolgenden Transpeptidierungsschritt wird die vorausgehende Aminosäure an die nachfolgende auf der Acceptorsite gebunden. Als Katalysator dieses Vorgangs wirken spezielle Strukturen des 50-S-Partikels sowie die an ihr verankerte Peptidyltransferase.

Die gebildete Peptidyl-tRNS wird in einem erneuten Translokationsschritt von der Acceptorsite auf die Donorsite bewegt (59,84,148,162). Während dieses Vorgangs wird gleichzeitig die aminosäurefreie tRNS der Donorsite an das Cytoplasma abgegeben (124).

Translokation und Transpeptidierung wiederholen sich so lange, bis das Protein fertiggestellt ist. Über die dabei erfolgende Bewegung der mRNS und die strukturellen Veränderungen der Ribosomen besteht noch keine Klarheit. Wie die Initiation ist auch die Elongation an bestimmte Proteine gebunden - die Elongationsfaktoren T_u, T_s und G (60,123, 187), die jedoch nicht an Ribosomen fixiert sind. Über die Spezifität dieser Faktoren bestehen noch unterschiedliche Auffassungen; offenbar scheinen einige aus procaryotischen

und eucaryotischen Systemen wechselseitig ersetzbar zu sein (38,109,188).

Faktor G besitzt GTPase-Aktivität (149) und spielt eine Rolle während der energieverbrauchenden Translokation, bei der GTP in GDP und P_i gespalten wird.

Faktor T_u wird bereits in den Initiationsvorgang einbezogen und bindet in Gegenwart von a-tRNS (81) an GTP (4) unter Bildung eines GTP-a-tRNS- T_u -Komplexes, der ein intermediäres Produkt der GTP-abhängigen Bindung von a-tRNS an Ribosomen ist (185). Nach neueren Untersuchungen wird pro a-tRNS-Ribosomen-Bindung 1 Molekül GTP (aus dem GTP-a-tRNS- T_u -Komplex) gespalten (157,82), während gleichzeitig unter Freisetzung von P_i ein T_u -GDP-Komplex (185) entsteht. Faktor T_u scheint demnach wie Faktor G GTPase-Aktivität zu besitzen (132). Die GTP-Hydrolyse während der a-tRNS-Anlagerung bewirkt jedoch noch keine Translokation. Erst, wenn ein freies GTP-Molekül eingeführt und gespalten wird, kann die Peptidyl-tRNS von der Acceptorsite auf die Donorsite transportiert werden. Demnach hydrolysieren 2 GTP-Moleküle pro Peptidbindung.

Die Bedeutung des Elongationsfaktors T_s liegt im Austausch von GDP aus dem T_u -GDP-Komplex gegen äquimolare Mengen T_s unter Bildung eines T_s - T_u -Komplexes (134).

Die Reaktionen, die zum Abbruch der Polypeptidsynthese führen, werden unter dem Begriff der Termination zusammengefaßt.

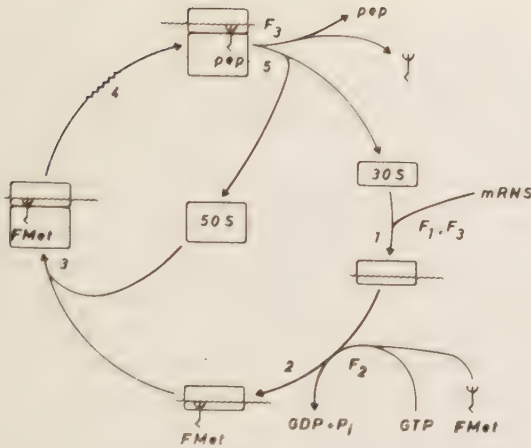


Abb. A

Initiation und Ribosomen-Zyklus

- 1) Bindung von mRNA an die 30 S-Ribosomen-Untereinheit
 - 2) Bindung von Aminoacyl-tRNA an den mRNA-30 S-Ribosomen-Komplex
 - 3) Anlagerung der 50 S-Ribosomen-Untereinheit
 - 4) Elongation
 - 5) Termination und Dissoziation des 70 S-Ribosoms
- In Anlehnung an OCHOA et al. (175).

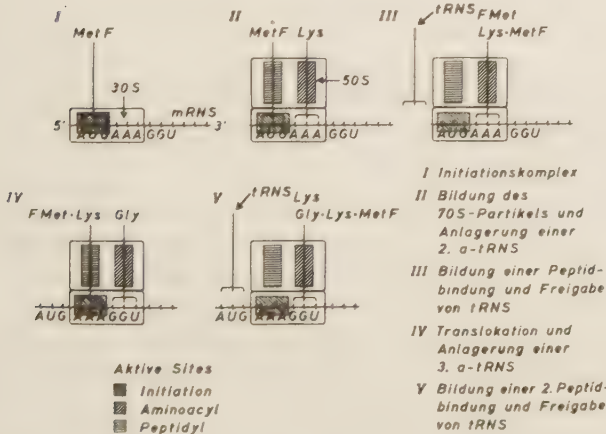


Abb. B

Schematische Darstellung der an den aktiven Sites des Ribosoms ablaufenden Reaktionen.
In Anlehnung an OCHOA (155).

Termination

Der Mechanismus der Terminierung von Polypeptidketten ist in allen Einzelheiten noch nicht aufgeklärt.

Seit längerem bekannt sind die sogenannten Nonsense-Codone UAG, UAA und UGA (24,177), die keine Aminosäure codieren (147) und in der Codefolge beim Durchgang durch das Ribosom zum Stillstand der Polypeptidsynthese führen. Die frühere Annahme, daß sich bestimmte aminosäurefreie tRNS an diese Tripletts anlagern, hat sich nicht bestätigen lassen (25). Dagegen wirken zwei andere Systeme auf die Termination ein, an denen weitere Faktoren beteiligt sind.

Die Releasefaktoren RF (33) bewirken die Freisetzung der kompletten Peptidkette, wobei zwei Spezifitäten unterschieden werden können (182): RF₁ wirkt auf UAG und UAA, während RF₂ an UAA und UGA fixiert wird. Die Affinität der Release-Faktoren zu ihren Terminationstripletts wird durch einen Stimulationsfaktor S (79,135) erhöht, der selbst keine RF-Aktivität besitzt.

Neben den Release-Faktoren wurde ein Dissoziationsfaktor DF (191) gefunden, der nach Freigabe der Ribosomen vom Messenger die 70 S Partikel in 50 S und 30 S Untereinheiten spaltet. Da DF an der kleinen Untereinheit verbleibt, wurde der Faktor schon früher mit einem Initiationsfaktor in Verbindung gebracht (138), was kürzlich für den Initiationsfaktor F₃ bestätigt wurde (175).

Auch bei der Termination fällt dem GTP eine Funktion zu. Der Proteinfaktor S stimuliert zunächst die Bildung eines RF-Nonsensecodon-Ribosom-Intermediärproduktes (ohne GTP), das durch GTP unter Mitwirkung von S dissoziiert (79). Ferner stimuliert GTP die Dissoziation von 70 S Ribosomen in Gegenwart von DF und ist durch kein anderes Ribonucleotid zu ersetzen. Eine Hydrolyse zwischen dem β - und γ -ständigen Phosphat darf ausgeschlossen werden, scheint aber für die α - β -Bindung möglich zu sein (80).

Die dissoziierten Ribosomen können erneut zu Protein synthetisierenden Polysomen aggregieren. Als Folge dieses Ribosomenzyklus findet ein ständiger Austausch der Ribosomenuntereinheiten statt.

Obwohl die Proteinsynthese in bakteriellen Systemen mit N-Formylmethionin gestartet wird, ist nur in wenigen Fällen der Formylmethioninrest am N-terminalen Ende der nativen Bakterienproteine nachzuweisen. Demnach müssen Enzyme wirksam werden, die FMet abspalten. Aus Bakterien ließ sich eine Peptiddeformylase isolieren, die spezifisch die Formylgruppe von endständigen Aminosäuren abspaltet und als Ameisensäure freigibt (1,2,218). Enzymatisch können neben FMet noch weitere Aminosäuren vom Proteinende abgespalten werden. Der Angriffsort des Enzyms dürfte dabei von der Tertiärstruktur des Proteins kontrolliert werden (2).

1.2.2 Die Proteinsynthese in Eucaryoten

Über den Ablauf der Proteinsynthese in höheren Organismen fehlen noch viele Detailkenntnisse, die von procaryotischen Systemen bereits erarbeitet sind. Grundsätzlich scheint aber die Aufklärung des Synthesemechanismus für Eucaryoten möglich zu sein.

Obwohl die bisher identifizierten Komponenten und Faktoren beider Systeme nicht identisch sind, verlaufen zahlreiche Schritte parallel. Dies gilt zunächst für die Initiation, an der ebenfalls 3 Initiationsfaktoren (M_1, M_2, M_3) beteiligt sind (84,85,165), die denen der Procaryoten ähneln. Die Bildung des Initiationskomplexes (91,96) vollzieht sich in der gleichen Weise wie bei Procaryoten, jedoch ist der eucaryotische Messenger (43,71) im Gegensatz zur polycistronischen mRNA aus Bakterien (106) monocistronisch. Zwei cytoplasmatische Met-tRNA-Arten sind entdeckt worden (119), von denen eine Art nicht formyliertes Methionin (27,129,221) in die N-terminale Position des Proteins einführt. Diese tRNA_{Met} kann demnach als Initiator-tRNA an-

gesehen werden. Unter Anwendung einer entsprechenden Enzymfraktion aus Bakterien ist eine Formylierung des an diese tRNS gebundenen Methionins beobachtet worden (169). AUG und wahrscheinlich auch GUG haben bei Eucaryoten die Eigenschaften eines Initiatorcodons (27,167). Aminosäureübertragende Faktoren sind vor wenigen Jahren beschrieben worden (172) und konnten weiter charakterisiert werden (3,31,168,180).

Dem Elongationsfaktor T (T_u und T_s) der Procaryoten entspricht die Transferase I, während eine ribosomenabhängige GTPase (Transferase II) dem bakteriellen G-Faktor gleichkommt. Im Gegensatz zu den Elongationsfaktoren (38,109,188) scheint eine aus Hefen isolierte Proteinfraction sehr spezifisch zu wirken, denn durch sie werden ausschließlich Heferibosomen dissoziiert (163). Ferner konnten Release-Faktoren aus tierischen Zellen isoliert (78,79) und die Nonsense-Codone UAG und UAA in Hefe (86) identifiziert werden.

1.3 Zellfreie Systeme

Die vorangegangenen Ausführungen stützen sich im wesentlichen auf Untersuchungen, die an proteinsynthetisierenden zellfreien Systemen mit künstlichem oder natürlichem Messenger (Phagen-RNS oder Hämoglobin-Messenger) durchgeführt wurden. Als Objekte dienten zahlreiche Organismen wie *Escherichia coli* (144,51), verschiedene andere Bakterien (12,41,47,107,173), Protozoen und Algen (37,68,69), *Neurospora crassa* (112), Seeigel (190), Säugetiere (42,99,120,216), menschliche Gewebe (21,160), ferner Zellorganelle wie Mitochondrien (112,176,122) und Chloroplasten (55) und nicht zuletzt Hefe. Als Vertreter der Eucaryoten eignet sich besonders die Hefe für Untersuchungen über den Mechanismus der Proteinsynthese, da sich nicht nur mit Erfolg zellfreie Systeme herstellen lassen, sondern auch genetische Experimente vergleichende Betrachtungen gestatten.

Eine erste kurze Mitteilung über den Aminosäureeinbau mit Heferibosomen wurde 1957 von WEBSTER (213) vorgelegt. Über die Art der Zellzertrümmerung berichteten BRETTHAUER et al. (26), während BARNETT et al. (11) von lysierten Protoplasten ausgingen. Von Bedeutung für die Gewinnung eines aktiven zellfreien Systems sind die Anzuchtbedingungen (LUCAS et al. (122), DIETZ et al. (49)) und die optimalen Konzentrationen der essentiellen Faktoren (MAEDA et al. (125), SO et al. (52,188), HEREDIA et al. (10,87)). Weitere Untersuchungen liegen sowohl über das Dissoziationsverhalten der Ribosomen (WALTERS et al. (207)) als auch über einen die Dissoziation stimulierenden Proteinfaktor (PÉTRE (163)) vor.

Die Charakterisierung von Elongationsfaktoren wurde im Besonderen von KLINK et al. (3,172) vorgenommen, während sich RAJBHANDARY et al. (167) um Probleme der Initiation und HAWTHORNE (86) um Terminationscodone bemühten.

Ferner sei erwähnt, daß es kürzlich gelungen ist, die DNS-abhängige-RNS-Polymerase (66) und DNS aus Hefe (104) zu isolieren.

1.4 Problemstellung

Die Arbeiten an der Hefe *Saccharomyces* haben zu großen Detailkenntnissen über weitgehend homozygote und isogene Stämme verschiedenen Ploidiegrades (115,116) geführt. Unter anderem wurden die Wirkungen von UV- und Röntgen-Strahlen mit genetischen und biochemischen Methoden untersucht (8,97,103,104,117,170,194).

Definitive Aussagen über den Mechanismus der Strahlenwirkung lassen sich aber allein aus Versuchen mit intakten Zellen schwer finden. Deshalb ist eine Fraktionierung in einzelne Zellbestandteile, die separat energiereicher Strahlung ausgesetzt werden können, von großer Bedeutung. Ein Protein synthetisierendes in vitro-System sollte daher die Orte strahlenbiochemischer Veränderungen leichter bestimmbar machen.

Von besonderem Interesse ist dabei ein System, in dem DNS Prägeraktivität besitzt. Da die Proteine sekundäre Genprodukte sind, könnte man aus ihrer Veränderung auf die strahlengeschädigten Orte der angebotenen DNS rückschließen.

Die besondere Strahlensensibilität und die sich daraus ergebenden molekularen Veränderungen des DNS-Moleküls sind bekannt, jedoch steht noch die Frage offen nach definierten strahlensensiblen Orten der Komponenten, die an der Translation beteiligt sind. Die Kenntnis über die Art dieser Veränderungen dürfte Aussagen über die Funktion einzelner an der Proteinsynthese beteiligter Komponenten ermöglichen.

Die vorliegende Arbeit soll mit der Darstellung eines funktionierenden Protein synthetisierenden zellfreien Systems aus *Saccharomyces* Stamm 211, diploid, die Grundlage für derartige Untersuchungen schaffen. Die Eignung dieses Systems, in dem künstliche Polynucleotide Messengerfunktion besitzen sowie DNS aus verschiedenen Organismen stimulierend auf die Proteinsynthese einwirkt, ist zu testen und mit anderen in vitro-Systemen zu vergleichen.

Die Empfindlichkeit von Zellfraktionen gegenüber Röntgenbestrahlung soll an Hand ihrer verminderten Fähigkeit, radioaktiv markierte Aminosäuren in Proteine einzubauen, untersucht werden.

Ferner soll festgestellt werden, inwieweit die Mikrokalorimetrie geeignet ist, Aussagen über den Ablauf der Proteinsynthese zu gewinnen.

Ziel dieser Untersuchungen ist es, zur weiteren Klärung des Mechanismus der Proteinsynthese in Eucaryoten beizutragen.

2. MATERIAL

Objekt:

Saccharomyces Stamm 211, diploid (LASKOWSKI (116)) diente für die Herstellung eines zellfreien Systems.

Zu gelegentlichen Versuchen mit Escherichia coli (E. coli) wurden Bakterienmassen benutzt, die von Prof. Wittmann zur Verfügung gestellt wurden.

Zellprodukte:

DNS aus dem gleichen Hefe-Stamm isolierte Dr. JANNSEN, während DNS des Phagen T4 von Prof. ZILLIG zur Verfügung gestellt wurde. Kalbsthymus-DNS war ein Produkt der Fa. SERVA, Heidelberg. Fa. SIGMA, St. Louis Missouri, lieferte tRNS aus Hefe und Fa. SCHWARZ, Orangeburg New York, tRNS aus E. coli.

Chemikalien:

Fa. SERVA lieferte ATP, GTP, UTP, CTP, PEP (K-Salz), 3-PG (Na₃-Salz), Poly U (K-Salz), DEAE-SH-Cellulose (Kapaz. 0,80) und 2-Mercaptoäthanol. Sephadex G75 wurde von Fa. PHARMACIA, Uppsala Schweden, hergestellt und RNase sowie PEP-Kinase (Kristallsuspension) waren Produkte der Fa. BOEHRINGER, Mannheim. Von Fa. MERCK, Darmstadt, wurden bezogen: Tris, Mg-acetat, NH₄Cl, KCl, Dioxan und Kieselgur. EDTA war ein Erzeugnis der Fa. FLUKA AG., Buchs SG Schweiz. POPOP und PPO wurden von TRACERLAB, Antwerpen Belgien, geliefert. Omnifluor und die radioaktiven Produkte wie ¹⁴C-L-Phenylalanin und ¹⁴C-L-Leucin stammten von NEW ENGLAND NUCLEAR Chemicals (NEN), Boston Massachusetts.

Geräte:

Ultrafilter LKB 6300 A (Dialyseschläuche),
LKB-PRODUKTER, Stockholm
Homogenisator Kobold, B. BRAUN, Melsungen
Homogenisator von E. BÜHLER, Tübingen

Filtriergestell für Sartorius-Membranfilter SM 11006025

A. HÖLZLE, München

Lichtelektrisches Kolorimeter mit Filter VBO, max. 525 nm,

B. LANGE, Berlin

Spektrophotometer DB-G, BECKMAN, Fullerton, Californien

UV-Durchflußmesser Uvicord, LKB-PRODUKTER, Stockholm

Flüssigkeits-Scintillationszähler, TRACERLAB, Antwerpen,
Belgien

Röntgengerät: Dermovolt (S) mit Machlett OEG-60 Röhre.

Eigenfilterung der Röhre: 1 mm Beryllium

Leistung: 30 Krad/Min bei 55 KV und 25 mA

Focus-Abstand: 6 cm,

R. SEIFERT & Co., Ahrensburg bei Hamburg

Mikrokalorimeter von E. CALVET

Christ-Zentrifuge, max. Drehzahl 5000 Upm

Christ-Zentrifuge, max. Drehzahl 20000 Upm

Spinco Ultra-Zentrifuge, BECKMAN, Modell L 50,

max. Drehzahl 50000 Upm, Rotoren: 50 T, SW 39 L

Christ-Durchlaufzentrifuge Junior 15000,

max. Drehzahl 15000 Upm

Kulturmedium:

2 % Glucose

1 % Difco-Yeast-Extrakt

0,5 % Pepton

in 1 l entmineralisiertem Wasser gelöst und

30 Min bei 123°C sterilisiert.

Standard-Puffer:

	TMA I	TMA II	TMA III	TMA IV	TMA V
Tris ac pH 7,5	0,01 M	0,03 M	0,03 M	0,03 M	0,03 M
Mg-acetat	0,01 M	0,01 M	0,0085 M	0,01 M	0,0085 M
NH ₄ Cl	0,022 M	0,022 M	0,022 M	0,022 M	0,022 M
2-Mercapto- äthanol	0,001 M	0,001 M	0,001 M	-	-

Mit Eisessig auf pH 7,5 eingestellt und

30 Min bei 123°C sterilisiert.

Angesetzt in bidestilliertem Wasser.

Scintillations-
flüssigkeit:

I: 4 g PPO

0,05 g POPOP

120 g Naphthalin

in 1 l Dioxan

II: 8 g Omnifluor

in 1 l Dioxan

3. AUFBAU DES ZELLFREIEN SYSTEMS

3.1 Übersicht

Die Hefe *Saccharomyces* wird in ausgewählten Kulturmedien gezogen und in definierten Entwicklungsphasen geerntet. Zur Gewinnung der für die Proteinsynthese benötigten Zellkomponenten - Ribosomen und Enzyme - müssen die Zellen zunächst aufgebrochen werden, wozu verschiedene Methoden bekannt sind. Zelltrümmer, Kerne und Mitochondrien werden in mehreren Zentrifugationsschritten aus dem Homogenisat abgetrennt und anschließend die Ribosomen bei $105000 \times g$ sedimentiert. Der enzymreiche Überstand wird einer weiteren Aufarbeitung unterzogen und für die Ribosomen bieten sich verschiedene Reinigungsmethoden an.

Die Proteinsynthese läuft in einem Inkubationsansatz ab, der Ribosomen, Überstandsenzyme, Magnesium- und Ammoniumsalze, ferner essentielle Faktoren wie Adenosintriphosphat (ATP), Guanosintriphosphat (GTP), Kalium-Phosphoenolpyruvat (PEP), PEP-Kinase, tRNS aus Hefe, Polyuridylsäure (Poly U) als künstlicher Messenger und radioaktives Phenylalanin enthält. Wird die Proteinsynthese an natürlichem Messenger vollzogen, so müssen dem Inkubationsansatz außerdem alle Aminosäuren zugesetzt werden und in einem DNS-abhängigen-RNS-gesteuerten Protein synthetisierenden System sind Uridintriphosphat (UTP) und Cytidintriphosphat (CTP) essentiell. Ferner muß die DNS-abhängige-RNS-Polymerase vorhanden sein. Als markierte Aminosäure kann jede gewählt werden, die in ausreichenden Anteilen im Protein enthalten ist. Häufig sind es ^{14}C -L-Leucin (^{14}C -Leu), ^{14}C -L-Phenylalanin (^{14}C -Phe) oder ^{14}C -L-Valin (^{14}C -Val).

Die Inkubation erfolgt gewöhnlich bei 30°C und dauert 60 Minuten. Nach dieser Zeit hat die Proteinsynthese ihren maximalen Wert erreicht. Durch kalte 10%ige Trichloressigsäure (TCA) lassen sich alle Proteine und a-tRNS-Moleküle ausfällen, von denen die letzteren beim Kochen des Nieder-

schlages im Wasserbad wieder in Lösung gehen. Mit 5%iger TCA wird der Niederschlag von nicht umgesetzten radioaktiven Aminosäuren freigewaschen, mit Scintillationsflüssigkeit aufgenommen und die Radioaktivität der Probe im Scintillationszähler gemessen.

Mit der Kenntnis der spezifischen Radioaktivität der zugesetzten Aminosäure errechnet sich daraus ihr Einbau in Proteine (angegeben in pMol/mg Ribosomen-Protein). Diese Größe ist ein Maß für die Leistungsfähigkeit des zellfreien Systems und wird im Falle des kompletten Inkubationsansatzes mit 100 % definiert. Der Ausfall einer Komponente schlägt sich in verminderter Einbaufähigkeit der markierten Aminosäure nieder und wird prozentual auf das komplette System bezogen.

Die Konzentration der einzelnen Komponenten des zellfreien Systems sind so eingestellt, daß die Ribosomen den limitierenden Faktor bilden, während alle anderen Substanzen im Überschuß vorhanden sind.

Die einzelnen Schritte der Methodik werden im folgenden ausführlich behandelt.

3.2 Anzucht und Ernte der Hefen

Die Bereitung eines aktiven Protein synthetisierenden zellfreien Systems aus Mikroorganismen macht es erforderlich, die Zellen in einer bestimmten Wachstumsphase zu ernten. Dieses Wachstum von Populationen einzelliger Organismen verläuft in flüssigen Nährmedien immer in der gleichen charakteristischen Weise. Die Wachstumsgeschwindigkeit ist zu verschiedenen Zeiten unterschiedlich und läßt deutliche Phasen erkennen.

In der Anlaufphase (lag-Phase) beginnt die Zellteilung nicht sofort nach Übertragen einer Vorkultur in frisches Medium, sondern erst nach einer Ruheperiode nimmt die Stoffwechseltätigkeit zu, der in der Beschleunigungsphase die

Zellteilung folgt. Wachstum und Zellteilung nehmen an Geschwindigkeit zu und erreichen am Ende dieser Phase ihren Höhepunkt. Die Kultur tritt nun in die Exponentialphase (log-Phase) ein, in der der Logarithmus der Zellzahl linear mit der Zeit zunimmt, d.h. jede Zelle vermehrt sich mit konstanter Geschwindigkeit. In der anschließenden Verzögerungsphase nimmt die Geschwindigkeit der Zellteilung infolge von Nährstofferschöpfung ab und in der stationären Phase bleibt die Zahl der lebenden Zellen konstant.

3.2.1 Der Einfluß der Wachstumsphase auf die Proteinsynthese in vitro

Zunächst wurde die Proteinsyntheseleistung in vitro von Zellen aus verschiedenen Wachstumsphasen getestet. Danach ist der Poly U-gesteuerte Phenylalanin-Einbau am höchsten für Kulturen, die sich am Ende der log-Phase befinden (Abb.1). Für alle weiteren Versuche wurden folglich nur Zellen aus dieser Wachstumsphase verwendet.

Ähnliche Beobachtungen, die eine strenge Abhängigkeit des Aminosäureeinbaus zellfreier Systeme von der Wachstumsphase beschreiben, sind von anderen Autoren sowohl an Hefe (49,122) als auch an *E. coli* (51,113) gemacht worden. Wie aus Arbeiten mit Hefe hervorgeht (122), ist die Aktivitätsänderung dabei in erster Linie eine Funktion der wechselnden Aktivität der Ribosomen und nicht der Überstandsenzyme. Die Ursache dürfte möglicherweise in dem Wandel der Zusammensetzung des Kulturmediums während der Entwicklung der Hefen zu suchen sein (49). Ein Anstieg des RNS-Gehaltes in der mittleren log-Phase sowie Kurzzeitmarkierungen mit ^{32}P -orthophosphat könnten einen Hinweis auf zunehmende Messenger-Aktivität geben (122). Allerdings könnte auch ein anderer an Ribosomen gebundener Faktor für die Aktivitätsänderung verantwortlich sein (49).

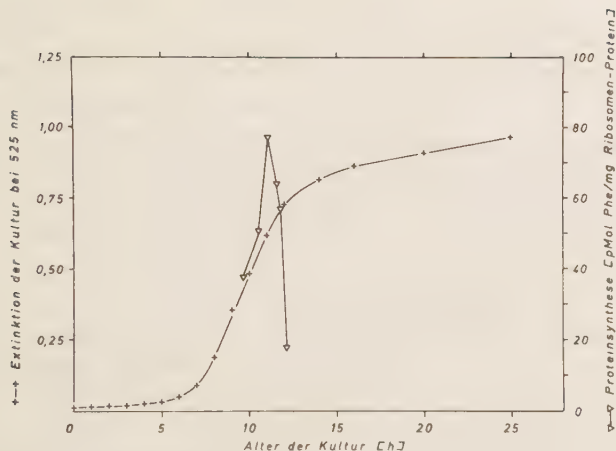


Abb. 1

+ - +: Wachstumskurve von *Saccharomyces* Stamm 211 diploid. Probenentnahme in bestimmten Zeitabständen. Messung der Extinktion (= Maß für die Zellzahl) im LANGE-Kolorimeter.

▽ - ▽: Abhängigkeit des Phe-Einbaus eines zellfreien Systems von Sacch. von der Ext. der Hefekultur. Inkubation 60 Min bei 30°C.

Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine: 1,7 - 2,3;

Überstands-Enzyme: 1,0 - 1,3;

Poly U: 0,05; tRNS: 0,125;

PEP-Kinase: 0,01;

in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85;

Mg ac: 14; Tris ac pH 7,5: 18;

Merc: 0,6; NH_4Cl : 13,2;

^{14}C -Phe (48,5 C/Mol): 0,01.

Unterschiedliche Enzymaktivitäten während der Entwicklung einer Hefepopulation könnten weitere Erklärungsmöglichkeiten für die verschiedenen Fähigkeiten zur Proteinsynthese in vitro geben. Die Aminopeptidase entfaltet in der mittleren log-Phase ihre höchste Aktivität, während für RNase in der stationären Phase die höchsten Werte registriert wurden (174).

3.2.2 Anzucht der Hefen

Zur Bereitung einer Vorkultur wurden 5 ml Medium mit Hefezellen beimpft und unter Schütteln bei 30°C bebrütet. Aus dieser Vorkultur genügten 4 ml zum Beimpfen von 2500 ml Medium bei 4°C. Unter leichtem Schütteln oder in einigen Fällen unter Belüftung wuchs die Hefekultur in 16 - 17 h bis zum Ende der log-Phase heran. Die Extinktion betrug zu diesem Zeitpunkt etwa 0,65. Geerntet wurde unter sofortiger Zugabe von Eis, worauf die Zellen in einer Durchlaufzentrifuge bei 9000 Upm gesammelt, 3 x mit eiskaltem m/10 KH₂PO₄-Puffer, 1 x mit kaltem TMA II-Puffer gewaschen und danach nochmals gut zentrifugiert wurden. Die Ausbeute an Hefefeuchtmasse betrug aus 200 l Medium reichlich 200 g und konnte bei -35°C einige Wochen aufbewahrt werden.

3.3 Aufschließen der Hefezellen

Ein schonendes Aufbrechen der Hefezellen ist für die Erhaltung der Ribosomenaktivität von besonderer Bedeutung. Dazu boten sich folgende Methoden an:

- Lysis von Protoplasten,
- Zerreiben mit Kieselgur,
- Homogenisieren mit Glasperlen.

Aus lysierten Protoplasten gewannen verschiedene Autoren (11,121,219) aktive Ribosomen. In der vorliegenden Arbeit fand die Methode von SHAHIN (184) Anwendung, wonach die Hefezellen bestimmten Kulturbedingungen unterzogen und in der frühen log-Phase (Ext. etwa 0,3) geerntet werden müssen.

Die Homogenisation mit Kieselgur erfolgte in 20 Minuten unter Reiben bei 4°C. Die Ribosomenausbeute war danach jedoch nur gering.

Von besserer Effektivität erwies sich ein Schütteln mit Glasperlen (Ø 0,45 - 0,5 mm), das im Homogenisator von E. BÜHLER 15 Minuten dauerte, während im Gerät von B. BRAUN

die Homogenisation bei einer Schüttelfrequenz von 4000 Upm nach einer Minute weitgehend vollständig war. Als zweckmäßig erwies sich dabei eine Mischung von 15 g Hefe-Feuchtmasse, 10 ml TMA-Puffer und 40 ml Glasperlen.

Mit den nach den 3 Aufschlußverfahren gewonnenen zellfreien Extrakten wurden Polyphenylalanin synthetisierende Systeme dargestellt, deren Brauchbarkeit aus Tab. 1 zu entnehmen ist.

Das aus Protoplasten hergestellte *Saccharomyces*-System zeigte dabei den geringsten Phenylalanin-Einbau. Da die Hefezellen zur Darstellung dieses Systems aus der frühen log-Phase geerntet wurden, ist die geringe Aktivität erklärlich (Kap. 3.2.1). Bessere Einbauraten wurden nach der Homogenisation der Zellen mit Kieselgur oder Glasperlen erzielt, wobei beide Verfahren ähnlich aktive Systeme lieferten. Nach JANDA (102) sollte jedoch das mit Kieselgur bereitete in vitro-System um den Faktor 4 aktiver sein. Die Stimulierung durch Poly U war in dem System, das durch Homogenisation der Zellen mit Glasperlen gewonnen wurde, am ausgeprägtesten. Dafür spricht, daß bei dieser Methode Polysomen-Aggregate zerstört werden, während bei den anderen Methoden den Ribosomen ein beträchtlicher Anteil an endogenem Messenger erhalten bleibt.

Die größere Ribosomenausbeute und die bessere Poly U-Abhängigkeit gaben Anlaß, in der vorliegenden Arbeit die Homogenisation der Hefezellen mit Glasperlen anderen Methoden vorzuziehen.

Nach dem Aufschluß der Hefezellen wurden alle Operationen im Eisbad oder bei 4°C im Kühlraum durchgeführt.

Aufschluß der Hefezellen	Lysis von Protoplasten	Homogenisation mit Kieselgur				mit Glasperlen	
		Proteinsynthese					
	pMol Phe/mg Ribo- somen-Protein	% Einbau	pMol Phe/mg Ribo- somen-Protein	% Einbau	pMol Phe/mg Ribo- somen-Protein	% Einbau	
Komplettes System	5,65	100	50,2	100	63,4	100	
minus Poly U		30		57		9	
minus tRNS		47		86		83	
minus ATP		15					
minus GTP		74					
minus energieliefere- des System				24		4	
minus Überst.-Enzyme		25		6		22	
minus Ribosomen		7		19		13	
plus inakt. Aminosäuren		70					

Tab. 1: Phenylalanin-Einbau verschieden präparierter Hefesysteme.

Inkubation 60 Min bei 30°C. Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine: 1,2 - 2; in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15;

Überstands-Enzyme: 1 - 1,8; PEP: 4,85; Mg ac: 14;

Poly U: 0,05; tRNS: 0,125; Tris ac: 18; Merc: 0,6;

PEP-Kinase: 0,01; NH_4Cl : 13,2;

^{14}C -Phe (48,5 G/Mol): 0,01

19 inaktive Aminosäuren: je 0,1

3.4 Aufarbeitung des Homogenisats

Die Glasperlen wurden auf einer Sinterglasfritte 17 G 2 abgetrennt und zweimal mit je 5 ml TMA-Puffer gewaschen. Unzerschlagene Zellen und grobe Zelltrümmer setzten sich nach der Zentrifugation (5 Min, 5000 Upm) ab, während kleine Bruchstücke und Mitochondrien bei 30000 x g in 20 Min sedimentierten. Der Überstand (S 30-Fraktion) enthielt die Ribosomen und alle weiteren für die Proteinsynthese essenziellen Enzyme.

3.4.1 S 30-Fraktion

In einem Versuch wurde auf die Abtrennung der Ribosomen von löslichen Bestandteilen verzichtet und die Fähigkeit dieser S 30-Fraktion zur Proteinsynthese an Hand des ^{14}C -Leu-Einbaus getestet (Tab. 2). Die Wirkung von zugesetzten Inhibitoren war nur wenig ausgeprägt. Dagegen war eine deutliche Aminoacylierung der tRNS festzustellen (Abb. 2), die sich aus der Differenz des ^{14}C -Leucin-Einbaus der mit heißer und kalter TCA fällbaren Niederschläge ergibt.

	Proteinsynthese	
	pMol Leu/ml S 30-Fraktion	% Einbau
Komplettes System	63	100
plus Puromycin		89
plus RNase		73
plus Chloramphenicol		88
minus energielieferndes System		71

Tab. 2: Leucin-Einbau in mit heißer TCA fällbare Proteine der S 30-Fraktion.

Inkubation 60 Min bei 30°C.

Ansätze zu 0,5 ml enthielten:

in mg: S 30-Proteine: 1,9; PEP-Kinase: 0,01;
Puromycin, Chloramphenicol, RNase: je 0,05;
in μMol : ATP: 1,18; GTP: 1,15; UTP: 1,24; CTP: 1,24;
PEP: 4,85; Mg ac: 13; Tris ac pH 7,5: 15;
Merc: 0,5; 19 inakt. Aminosäuren: je 0,08;
 NH_4Cl : 11; ^{14}C -Leu (3 C/Mol): 0,1.

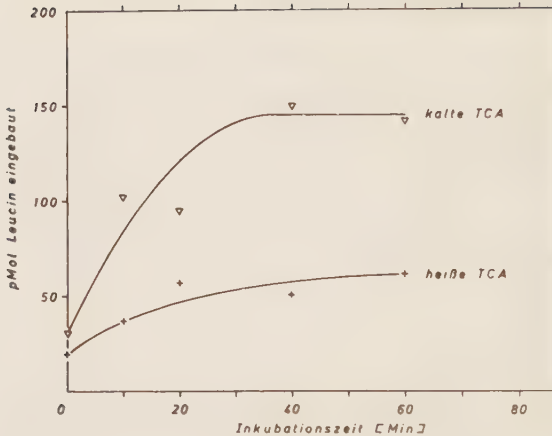


Abb. 2

Zeitlicher Verlauf des Leucin-Einbaus in mit TCA fällbare Proteine einer S 30-Fraktion aus *Saccharomyces*. Die Inkubationsbedingungen entsprachen denen unter Tab. 2 für das komplette System.

3.4.2 Ribosomen und Überstands-Enzyme

Durch hochtourige Zentrifugation der S 30-Fraktion in der Spinco-Ultrazentrifuge (90 Min, 105000 x g) sedimentieren die Ribosomen als gelbliche gallertige Masse, die weiterhin Ribosomen-Fraktion RF_{roh} genannt wird. Sie ist von einer milchig weißen Schicht überlagert.

Von dem Überstand, in dem sich alle zur Proteinsynthese benötigten Enzyme befinden, wurden die oberen zwei Drittel vorsichtig mit einer Spritze entnommen und im folgenden mit Enzymfraktion EF_{roh} bezeichnet. In einem DNS-abhängigen System gelangte der gesamte Überstand einschließlich der milchig weißen Schicht, die sonst verworfen wurde, zur Anwendung. Eine Reinigung von EF_{roh} erwies sich als unbedingt erforderlich. Daneben wurde auch RF_{roh} verschiedenen Reinigungsmethoden unterzogen.

3.4.3 Behandlung der Enzymfraktion

3.4.3.1 Gelfiltration und Analyse der Enzymfraktion

Durch Gelfiltration der Enzymfraktion ließ sich der von Poly U stimulierte Einbau von ^{14}C -Phenylalanin um den Faktor 8 verbessern. Zur Reinigung bewährte sich das modifizierte Dextrangel Sephadex G75, mit dem Substanzgemische vom Molekulargewicht 3000 - 70000 g/Mol fraktioniert werden können.

Für die Trennung von 5 ml EF_{roh} eignete sich eine 25 cm lange Säule, $\varnothing = 2,5 \text{ cm}$.

Während des Eluierens mit TMA-Puffer ließen sich zwei "Peaks" photometrisch nachweisen (Abb. 3).

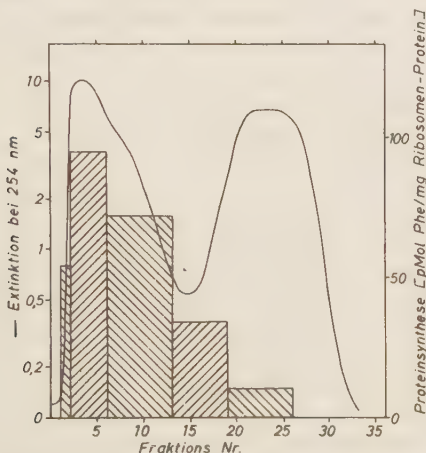


Abb. 3

Aminosäure-Einbau in Proteine in Gegenwart von verschiedenen Enzymfraktionen der Sephadex G75-Trennung. Inkubation 60 Min bei 30°C .

Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine: 1; Enzyme: 1,35;
Poly U: 0,05; tRNS: 0,5; PEP-Kinase: 0,01;
in μMol : ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85; Mg ac: 14;
Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6; NH_4Cl : 13,2;
 ^{14}C -Phe (5 C/Mol): 0,1.

Der Gehalt der Fraktionen an Proteinen und Nucleinsäuren wurde nach WARBURG und CHRISTIAN (230) bestimmt. Diese Methode nutzt die UV-Absorption des Tyrosin- und Tryptophan-Anteils der Proteine bei 280 nm bzw. der Nucleinsäuren bei 260 nm. Nach Messung der Extinktionen bei 260 nm und 280 nm im Beckman-Spektrophotometer kann mit Hilfe eines von WARBURG tabellarisch angegebenen Faktors F nach der Formel:

$$\text{Proteinkonzentration (mg/ml)} = F \cdot \frac{1}{d} \cdot \text{Extinktion (280 nm)}$$

unmittelbar auf den Proteingehalt geschlossen werden.

d = Durchmesser der Küvette in cm. F ist abhängig vom Verhältnis der beiden Extinktionen.

Für die chemische Bestimmung von RNS bot sich die Methode von WEBB (212) und für die DNS-Bestimmung die von WEBB und LEVY (211) an. Proteine wurden nach der Biuret-Reaktion umgesetzt und photometriert (230).

Die Zusammensetzungen von EF_{roh} und der Fraktion des 1. Peaks (= EF_{G75}) aus der Sephadex G75-Trennung sind in Tab. 3 gegenübergestellt.

	Proteine %	Gesamt- Nuclein- säuren %	DNS %	RNS %
EF_{roh}	94,89	5,1	4,11	1,02
EF_{G75}	95,55	4,44	3,33	1,12

Tab. 3: Zusammensetzung von EF_{roh} und der Fraktion des 1. Peaks aus der Trennung an Sephadex G75.

Der optimale Aminosäure-Einbau wurde für Fraktionen gefunden, die dem Maximum des 1. Peaks entsprechen (Abb. 3). Deshalb wurden weitere zellfreie Systeme mit diesen Fraktionen aufgebaut, die im folgenden mit EF_{G75} und einem zusätzlichen Index für den verwandten Puffer bezeichnet werden.

Vor Gebrauch der Enzymfraktion wurden gröbere Verunreinigungen bei 30000 x g abzentrifugiert und der Zellextrakt anschließend in Portionen bei -35°C eingefroren. Bis zum Einsatz im zellfreien System wurde nur einmal aufgetaut.

3.4.3.2 Fraktionierung an DEAE-Cellulose

In Anlehnung an die Arbeit von TRAUB und ZILLIG (200) wurde auch eine Reinigung von EF_{roh} an DEAE-Cellulose versucht, mit dem Ziel, Nucleasen und tRNS aus der Enzymfraktion zu eliminieren.

Vor Gebrauch wurde die Cellulose abwechselnd mit 0,1 M NaOH und 0,1 M HCl gewaschen, wobei zuletzt eine Laugenbehandlung erforderlich war. Für die Fraktionierung von 20 ml EF_{roh} genügten 10 g DEAE-Cellulose. Die Eluierung der adsorbierten Enzyme wurde in einer Säule (2,5 cm x 25 cm) mit zwei verschiedenen Puffern ($\text{TMA}_{0,23}$, $\text{TMA}_{0,27}$) versucht.

Elutionspuffer:	$\text{TMA}_{0,23}$	$\text{TMA}_{0,27}$
Tris ac pH 7,5	0,03 M	0,03 M
Mg ac	0,01 M	0,01 M
Merc	0,001 M	0,001 M
NH_4Cl	0,23 M	0,27 M

Dabei wanderten die Proteine mit der Lösungsmittelfront entweder in zwei dicht aufeinander folgenden Peaks oder als ein Peak. Alle Fraktionen bauten in vitro Aminosäuren in Protein ein (Tab. 4a/b).

Die Abhängigkeiten von den einzelnen essentiellen Faktoren waren recht unterschiedlich ausgeprägt; dies gilt besonders für Poly U. Ein System, wie es Versuch 6 zeigt, konnte nicht wieder reproduziert werden. Bemerkenswert erscheint, daß in einigen Versuchen keine Aminoacylierung der tRNS festgestellt werden konnte (Abb. 4).

Versuch Nr.	Elutions-puffer	Eluat	pMol Phe/mg Ribosomen-Protein	pMol Leu/mg Ribosomen-Protein
1	TMA _{0,23}	ein Peak	66	
2	TMA _{0,27}	1. Peak 2. Peak 1.+ 2. Peak		56,2 52 56,8
3	TMA _{0,27}	ein Peak	72	
4	TMA _{0,27}	ein Peak	21,8	

Tab. 4a: Aminosäure-Einbau in vitro mit verschiedenen an DEAE-Cellulose gewonnenen Enzymfraktionen.

Versuch Nr.	1	4	5	6
Elutions-puffer	TMA _{0,23}	TMA _{0,27}	TMA _{0,27}	TMA _{0,27}
komplettes System pMol Phe/mg Ribosomen-Protein	66 = 100 %	21,8 = 100 %	54,6 = 100 %	203 = 100 %
minus Poly U	97 %	80 %	80 %	7 %
minus tRNS	88 %	117 %	96 %	2 %
minus energielieferndes System	29 %	32 %	10 %	5 %
minus Enzyme	21 %		0 %	22 %
minus Ribosomen	6 %		15 %	0 %

Tab. 4b: Abhängigkeiten Protein synthetisierender Systeme von essentiellen Faktoren. Enzymfraktionen mit verschiedenen Puffern von DEAE-Cellulose eluiert. Inkubation 60 Min bei 30°C.

Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine: 1-1,5; tRNS: 0,5;
Enzyme: 0,5-0,9; Poly U: 0,05;
PEP-Kinase: 0,01.

in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85;
Mg ac: 13; Tris ac pH 7,5: 15;
Merc: 0,5; NH₄Cl: 11;
¹⁴C-Phe (5 C/Mol): 0,1.

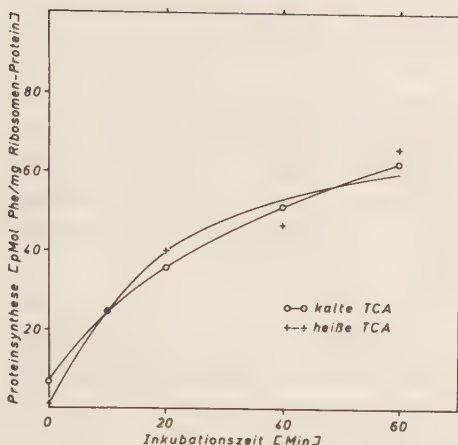


Abb. 4

Zeitlicher Verlauf des Phenylalanin-Einbaus in Proteine.
Enzymfraktion mit TMA_{0,23} von der DEAE-Cellulose eluiert.

Der Ausfall der Aminoacylierung von tRNA_{Phe} in einigen zellfreien Systemen dürfte möglicherweise auf ein Fehlen der entsprechenden Phenylalanyl-tRNA-Synthetase zurückzuführen sein, die entweder nicht an DEAE-Cellulose absorbiert oder im anderen Fall so fest gebunden vorlag, daß die Ionenstärke des Elutionspuffers nicht ausreichte, um das Enzym aus seiner Bindung an DEAE-Cellulose zu lösen. Ein Fehlen von Phe-tRNA müßte dann auch zwangsläufig eine verminderte Abhängigkeit von Poly U zur Folge haben, wie sie tatsächlich gefunden wurde. Zu erklären ist allerdings nicht, warum Versuch 6 trotz gleicher Aufarbeitung der zellfreien Fraktionen ein so viel besseres System lieferte als die anderen Präparate.

Wegen dieser Unsicherheit wurde auf eine weitere Reinigung der Enzyme an DEAE-Cellulose verzichtet.

3.4.3.3 Dialyse der Enzymfraktion

Die bisherigen Aufarbeitungen der Enzymfraktion führten zu zellfreien Systemen mit nicht immer voll befriedigenden und wenig reproduzierbaren Abhängigkeiten gegenüber essentiellen Faktoren. Deshalb sollte festgestellt werden, ob durch Dialyse der Enzymfraktion eine Verbesserung erreicht werden kann. Es wurden zwei Versuche mit unterschiedlichen Puffern durchgeführt.

1. Versuch:

3 ml EF_{roh} wurden in einem Dialyseschlauch gegen 1 l Tris-Puffer (Tris ac pH 7,2: 0,01 M; Mg ac: 0,004 M; KCl: 0,02 M; Merc: 0,0005 M) 5 h dialysiert.

Im Protein synthetisierenden System zeigte die dialysierte Enzymfraktion eine um den Faktor 4 höhere Aktivität als EF_{roh} (Tab. 5).

2. Versuch:

Durch 16-stündige Dialyse von EF_{roh} gegen Standardpuffer TMA II wurde eine Enzymfraktion erhalten, bei deren Einsatz im zellfreien System die Stimulierung durch Poly U sehr zu wünschen übrig ließ (Tab. 5).

3.4.3.4 Zusammenfassung

Zur Aktivierung des zellfreien Systems durch Reinigung der rohen Enzymfraktion erwies sich die Fraktionierung an Sephadex G75 am zuverlässigsten. Deshalb wurde diese Methode für die folgenden Versuche bevorzugt angewendet.

	EF _{roh} pMol Leu/mg Ribosomen- Protein	EF _{dialysiert}	
		1. Versuch pMol Leu/mg Ribosomen- Protein	2. Versuch pMol Phe/mg Ribosomen- Protein
Komplettes System	3,55	14,1	13,9
	= 100 %	= 100 %	= 100 %
minus Poly U			80 %
minus tRNS	88 %	108 %	89 %
minus energieliefern- des System	0 %	21 %	15 %
minus Überst.-Enzyme			11 %
minus Ribosomen	77 %	32 %	0 %
plus Chloramphenicol	62 %		
plus Actinomycin	127 %		
plus Puromycin	52 %		

Tab. 5: Proteinsynthese in vitro in Gegenwart von roher und dialysierter Enzymfraktion. Inkubation 60 Min bei 30°C. Ansätze zu 0,5 ml enthielten:
in mg: Ribosomen-Proteine: 1,15 - 1,8;
Enzyme (roh): 0,7 bzw. (dialysiert): 1,25;
PEP-Kinase: 0,01; tRNS: 0,125;
in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85;
EF_{roh} und EF_{dia}, 1. Vers.: UTP: 1,24;
CTP: 1,24; 19 inakt. Aminosäuren: je 0,08;
Tris ac: 12; KCl: 7; Mg ac: 10,8; Merc: 0,325;
NH₄Cl: 6,6; ¹⁴C-Leu (10 C/Mol): 0,1;
EF_{dia}, 2. Vers.: Mg ac: 4; Tris ac: 15;
Merc: 0,5; NH₄Cl: 11; ¹⁴C-Phe (48,5 C/Mol):
0,01.

3.4.4 Behandlung der Ribosomen

Um die Ribosomen von eventuell noch anhaftenden Enzymen zu befreien und den endogenen Messenger abzutrennen, wurde das Ribosomensediment RF_{roh} verschiedenen Reinigungsmethoden unterzogen:

Waschen mit verschiedenen Standard-Puffern
Waschen mit Puffern hoher NH_4Cl -Konzentration
Präinkubation mit RNase
Präinkubation mit energieliefernden Substanzen
Dissoziation der Ribosomen in Untereinheiten:
 EDTA-Behandlung
 Dialyse gegen Puffer mit niedriger
 Mg-Konzentration
 Spaltung in KCl-haltigen Puffern.

Zur Charakterisierung der Ribosomen wurde die Dichtegradienten-Zentrifugation herangezogen.

3.4.4.1 Dichtegradienten-Zentrifugation von Ribosomen

Bei der analytischen Ultrazentrifugation bedient man sich eines optischen Systems, welches eine ständige Beobachtung des Sedimentationsverlaufs gestattet und durch Aufnahme entsprechender Daten die Bestimmung des Molekulargewichtes von Makromolekülen sowie deren Form, Größe und Dichte ermöglicht (58,178). Das auf ein dichteres Medium (CsCl- oder Sucrose-Lösung) aufgetragene Substanzgemisch wird im angelegten Schwerfeld in Banden verschiedener Teilchengröße zerlegt (54,133).

Für die Sedimentationsgeschwindigkeit s eines Teilchens gilt folgende Beziehung:

$$s = \omega^2 r \frac{V(\rho' - \rho)}{f}$$

ω = Winkelgeschwindigkeit des Rotors
 r = Abstand vom Rotationszentrum
 V = Teilchenvolumen
 ρ' = Dichte des Teilchens
 ρ = Dichte des Mediums
 f = Reibungsfaktor

Die von SVEDBERG und PEDERSEN (192) definierte Sedimentationskonstante S

$$S = \frac{s}{\omega^2 r}$$

wird in 10^{-13} sec (SVEDBERG-Einheit) angegeben und kann zur Charakterisierung von Teilchen verwendet werden.

Mit einem Ribosomenpräparat RF_{TMA I} (Kap. 3.4.4.2) wurde eine analytische Ultrazentrifugation am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik, Berlin, durchgeführt. Bei beginnender Sedimentation ließ sich die Auftrennung der verschiedenen großen Teilchen mit nacheinander vorgenommenen photographischen Aufnahmen (Abb. 5) verfolgen. Unter Einbeziehung aller für die Versuchsanordnung konstanter Faktoren nimmt die SVEDBERG-Beziehung folgende Form an:

$$S = c \frac{\Delta \lg r}{\Delta t}$$

c = Konstante = $6,08 \cdot 10^{-9}$
 r = Strecke in cm, um die sich der Peak vom Rotationszentrum in der Zeit Δt entfernt

In 2 Sedimentationsläufen wurden für die einzelnen Teilchen SVEDBERG-Konstanten ermittelt, die in Tab. 6 aufgeführt sind.

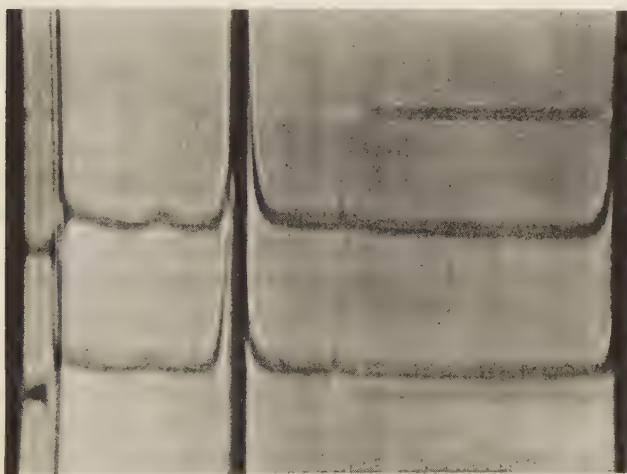


Abb. 5

Sedimentationsverhalten einer Ribosomenfraktion RF_{TMA I} in der analytischen Ultrazentrifuge.

Form der Ribosomen	Sedimentationslauf 1		Sedimentationslauf 2	
	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 1	Versuch 2
Disomen	112,5 110,2 103,4	114,8	122,4	115,5
Monosomen (Hauptpeak)	72,9	74,5	73,7	75,2
kleine Untereinheit	39,5	-	39,5	41,0

Tab. 6: SVEDBERG-Konstanten ribosomaler Partikel, die im Verlauf einer analytischen Ultrazentrifugation von Ribosomen (RF_{TMA I}) aufgetrennt wurden.

Zum Vergleich wurde mit demselben Ribosomenpräparat RF_{TMA I} eine Dichtegradienten-Zentrifugation (Sucrose 5-50 %) (Spinco Ultrazentrifuge, Rotor SW 39L) durchgeführt, die jedoch neben Monosomen keine weiteren Bestandteile zu erkennen gab (Abb. 6a).

Durchführung der Dichtegradienten-Zentrifugation

Der Gradient wurde aus Sucroslösungen mit einem Konzentrationsgefälle von 5 - 50 % hergestellt. Die aufgegebene Ribosomensuspension enthielt in 0,5 ml 1-2 mg Ribosomen-Protein. Um Veränderungen der Ribosomenstruktur beim Durchgang durch die Sucroslösung zu vermeiden, wurde die Sucrose in dem gleichen Puffer wie die Ribosomen angesetzt.

Im allgemeinen lief die Zentrifugation über 3 h mit 50000 - 55000 x g. Danach wurde die Lösung in Fraktionen abgezapft, verdünnt und die Extinktion bei 260 nm gemessen. Die graphische Darstellung der Extinktionen gegen die Fraktionsnummern gibt ein anschauliches Bild von der Verteilung UV-positiven Materials im Dichtegradienten.

Danach sedimentieren in Standard-TMA-Puffer gewaschene Ribosomen ausschließlich als Monosomen (Abb. 6a). Die Lage der Untereinheiten wurde mit separierten 40 S- und 60 S-Partikeln aus *Saccharomyces* bestimmt (Abb. 6b). Diese graphischen Darstellungen dienen als Bezugsobjekte für weitere Untersuchungen mit Ribosomenpräparaten.

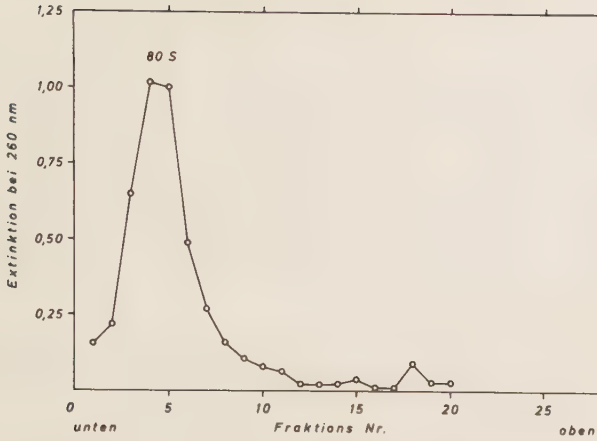


Abb. 6a
Ribosomen-Fraktion RF_{TMA I}

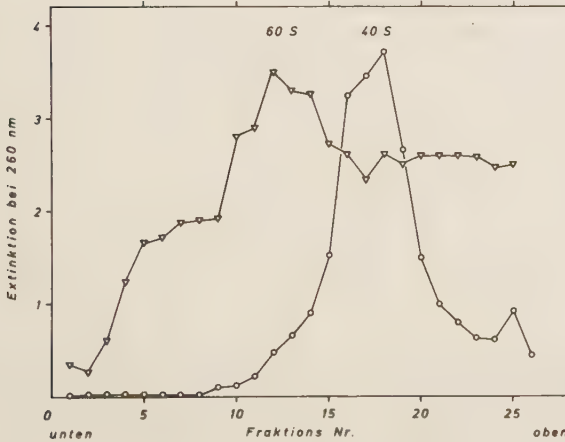


Abb. 6b
Separierte Untereinheiten

Abb. 6a/b: Dichtegradienten-Zentrifugation von Ribosomenpräparaten.
Gradient: Sucrose 5 - 50 %.
Zentrifugation 3 h, 55000 x g.

3.4.4.2 Waschen der Ribosomen mit verschiedenen TMA-Puffern

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Ribosomen in allen 5 Standardpuffern - TMA I bis TMA V - präpariert ($RF_{TMA\ I}$ bis $RF_{TMA\ V}$). Das Sediment RF_{roh} wurde in dem jeweiligen Puffer suspendiert, 80 Min mit 105000 x g zentrifugiert, in dem gleichen Puffer resuspendiert und erneut 20 Min bei 25000 x g zentrifugiert, um grobe Partikel abzutrennen. Der die Ribosomen enthaltende Überstand wurde in kleinen Portionen bei $-35^{\circ}C$ eingefroren und bis zu einem in vitro-Versuch nur einmal aufgetaut.

Im Protein synthetisierenden System zeigten die mit verschiedenen Puffern gewaschenen Ribosomen keine nennenswerten Unterschiede. Die variierende Poly U-Abhängigkeit (Tab. 7) ließe sich durch die präparationsbedingten Schwankungen im Gehalt an endogenem Messenger erklären.

Mg^{++} -Konz. im Inkubationsansatz	10 mM	23,3 mM	8,5 mM	23,3 mM	8,5 mM
Ribosomen- Präparat	$RF_{TMA\ I}$	$RF_{TMA\ II}$	$RF_{TMA\ III}$	$RF_{TMA\ IV}$	$RF_{TMA\ V}$
Vers. Nr.1	11	9	22	6	10
Vers. Nr.2	15	12	33	6	
Vers. Nr.3	22	13	33	8	
Vers. Nr.4	28	18	27	10	
Vers. Nr.5	33	26		15	
Vers. Nr.6	36	33		18	
Vers. Nr.7	45	35		23	

Tab. 7: Poly U-Abhängigkeit in % bez. auf das komplette System verschiedener Phe-einbauender in vitro-Systeme. Ribosomen in verschiedenen Puffern gewaschen. Inkubationsbedingungen entsprechen den Standard-Versuchen und variieren lediglich in der Mg^{++} -Konzentration.

3.4.4.3 Waschen der Ribosomen mit Puffern hoher NH₄Cl-Konzentration

Die als Initiationsfaktoren erkannten Proteine lassen sich mit NH₄Cl-haltigen Puffern von den Ribosomen ablösen (100). Die so behandelten Ribosomen können mit natürlichem Messenger nicht mehr arbeiten, wohl aber mit Poly U. Zum Studium der Aminosäurepolymerisation und der nichtenzymatischen Bindung von ¹⁴C-Phe-tRNS sollen Heferibosomen geeignet sein, die mit 0,5 M NH₄Cl-Puffer behandelt waren (10).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Ribosomen aus Saccharomyces mit verschiedenen NH₄Cl-Puffern gewaschen.

Waschpuffer	A	B	C	D	E
NH ₄ Cl	0,2 M	0,3 M	0,3 M	0,5 M	0,2 M
Tris ac pH 7,5	0,01 M	0,01 M	0,01 M	0,01 M	0,01 M
Mg ac	0,03 M	0,03 M	0,05 M	0,02 M	0,01 M
Merc	0,001 M	0,001 M	0,001 M	0,001 M	0,001 M

RF_{roh} wurde in dem jeweiligen Waschpuffer suspendiert (20 mg Ribosomen-Protein/ml), 20 Min bei 4°C leicht gerührt und in 60 Min bei 105000 x g sedimentiert. Die weitere Behandlung erfolgte in einem Standardpuffer. Eine Erhöhung der Mg⁺⁺-Konzentration im NH₄Cl-Puffer über 0,02 M war zur Stabilisierung der Ribosomenstruktur (Abb. 7) und zur Aktivierung der Ribosomen im zellfreien System unbedingt erforderlich (Tab. 8).

Auch an E. coli-Ribosomen konnten Veränderungen während einer Dialyse gegen Mg⁺⁺-freien NH₄Cl-Puffer festgestellt werden (186). Die abgespaltenen Partikel wurden als 5 S RNS identifiziert, die ein Bestandteil der 50 S-Untereinheit ist und in Gegenwart von Mg⁺⁺ nicht durch NH₄Cl abgespalten wird. Ähnliche Reaktionen mögen auch für die Heferibosomen zutreffen, wobei die Stabilität der Ribosomenstruktur durch ein richtiges Verhältnis von Mg⁺⁺ zu NH₄Cl gewährleistet sein müßte.

Waschpuffer	A	B	C	E
Komplettes System pMol Phe/mg Ribosomen- Protein	45 = 100 %	62 = 100 %	279	0,8 = 100 %
minus Poly U	37 %	45 %		40 %
minus tRNS	119 %	63 %		60 %
minus energielieferndes System	56 %	6 %		21 %
minus GTP	36 %			
minus Enzyme	17 %	11 %		5 %
minus Ribosomen	9 %	0 %		17 %

Tab. 8: Protein synthetisierendes zellfreies System.

Ribosomen gewaschen mit NH_4Cl -Puffer.

Inkubation 60 Min bei 30°C .

Ansätze zu 0,5 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine: 1-1,2; Enzyme: 0,8-1,2;

Poly U: 0,05; tRNS: 0,25; PEP-Kinase: 0,01;

in μMol : ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85; Mg ac: 13;

Tris ac pH 7,5: 15; NH_4Cl : 11; Merc: 0,5;

^{14}C -Phe (5 C/Mol): 0,1.

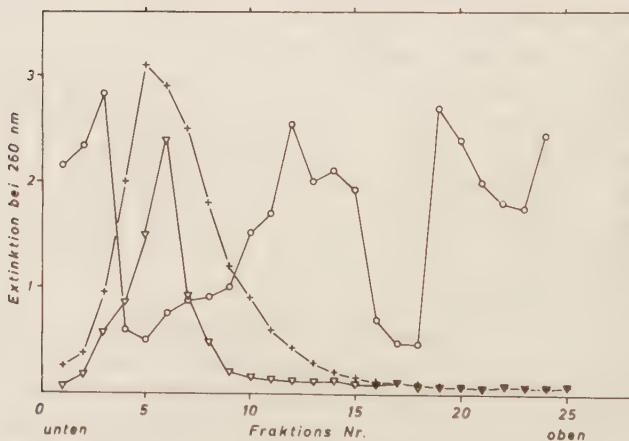


Abb. 7

Dichtegradienten-Zentrifugation. Sucrose: 5-50 %, 55000 x g; 3 h. Ribosomen gewaschen in Puffer A ($\nabla-\nabla$), Puffer C (+ - +) und Puffer D (o - o).

Eine bessere Eignung dieser Ribosomen zur Proteinsynthese in vitro gegenüber den mit Standardpuffern gewaschenen Ribosomen konnte in dieser Arbeit nicht festgestellt werden.

3.4.4.4 RNase-Behandlung

Eine kurze Inkubation der Ribosomen mit RNase sollte vornehmlich den endogenen Messenger abbauen. So gelang es, Polysomen aus Reticulocyten durch RNase-Behandlung vollständig in Monosomen umzuwandeln ohne die ribosomale RNS anzugreifen (220). Mit RNase behandelte Heferibosomen zeigten allerdings im vorliegenden Fall keine Fähigkeit zur Polyphenylalaninsynthese und waren nach Untersuchung durch eine Dichtegradienten-Zentrifugation völlig degradiert (Abb. 8).

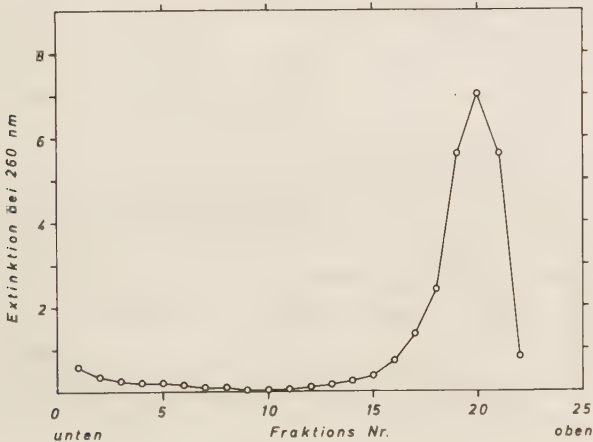


Abb. 8

Dichtegradienten-Zentrifugation in Sucrose (5-50 %) mit 30000 x g; 4 h. Ribosomen mit RNase präinkubiert. 1 ml RF_{TMA I} (35 mg Ribosomen-Protein) mit 0,1 mg RNase 1 h bei 30°C inkubiert, sedimentiert, mit TMA I-Puffer gewaschen und resuspendiert.

3.4.4.5 Präinkubation mit energieliefernden Substanzen

Bei *E. coli* hat sich die Präinkubation der Ribosomen mit ATP bewährt (200), was zum Verbrauch des endogenen Messengers unter Aminosäurepolymerisation führt und somit die Bindungsstellen für Poly U freigibt. Da ATP wie alle Nucleotide ein bekannter Komplexbildner für Magnesium ist - dasgleiche gilt für Phosphoenolpyruvat - kann es die Konzentration des freien Mg^{++} unter die für die Stabilität der Ribosomen notwendige Grenze erniedrigen, so daß die Polysomen zerfallen und eine Polypeptidsynthese kaum noch nachweisbar wird (166).

Unter Berücksichtigung dieser Erfahrungen wurde die Methode auf ihren Erfolg im Hefesystem getestet (Tab. 9).

1. Versuchsreihe				2. Versuchsreihe				
Versuch	a	b	c	Versuch	a	b	c	d
RF _{TMA I}	36	40	27	RF _{TMA II}	85	80	97	80
RF _{ATP}	30	12	22	RF _{ATP+Mg}	68	108	102	69

Tab. 9: Poly U-Abhängigkeit in % bez. auf das komplette System mit verschiedenen in Standardpuffern gewaschenen und mit verschiedenen ATP-präinkubierten Ribosomen. Inkubationsbedingungen wie bei Standardversuchen.

1. Versuchsreihe: 30 mg Ribosomen-Protein mit 0,5 mg ATP und 1,5 mg 3-PG in 1 ml Puffer 30 Min bei 30°C geschüttelt, sedimentiert, resuspendiert in TMA I-Puffer.
2. Versuchsreihe: 90 mg Ribosomen-Protein mit 3 μ Mol ATP, 6 μ Mol 3-PG und 6 μ Mol Mg ac in 3,6 ml Puffer 1 h bei 30°C geschüttelt, sedimentiert, resuspendiert in TMA II-Puffer.

Diese Ergebnisse zeigen kaum eine verbesserte Stimulierung durch Poly U. Die ATP-Präinkubation wurde daher nicht weiter verfolgt.

3.4.4.6 Dissoziation der Ribosomen in Untereinheiten

Die Dissoziation der Ribosomen unter Freisetzung von mRNS läßt sich in vitro induzieren. Zuerst wurde bei *E. coli*-Ribosomen als Folge erniedrigter Mg^{++} -Konzentration der Zerfall in definierte Untereinheiten (30 S und 50 S) beobachtet (198). Die gleichen Eigenschaften zeigen auch Ribosomen aus Eucaryoten, die in 40 S und 60 S-Partikel zerfallen. Die Verknüpfung der beiden Partikel erfolgt durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Nucleinsäurebasen der großen und kleinen Untereinheit und wird sowohl durch Mg^{++} als auch K^+ stabilisiert (7). Außerdem soll der 5 S-RNS eine unmittelbare Verbindungsfunktion zukommen (136).

Bei Erniedrigung der Mg^{++} -Konzentration werden zunächst die Strukturen der Untereinheiten entfaltet und die Mg^{++} -abhängigen Bindungen gelockert (16). Dies kann durch starke Komplexbildner (EDTA), durch Verdrängen mittels einwertiger Kationen (K^+) oder auch durch Dialyse gegen Puffer niedriger Mg^{++} -Konzentration erfolgen. Als weitere Methoden zur Dissoziation der Ribosomen werden Ultrabeschallung (229) und die Behandlung mit Polyvinylsulfat (224) angegeben.

Die Untereinheiten lassen sich durch Ultrazentrifugation von abdissoziiertem Messenger trennen und sind in geeigneten Medien unter Reassoziaton mit angebotener künstlicher oder natürlicher mRNS zur Proteinsynthese befähigt.

Zur Spaltung der Heferibosomen wurden 3 Methoden erprobt:

1. EDTA-Behandlung
2. Dialyse gegen Puffer geringer Mg^{++} -Konzentration
3. Behandlung mit KCl-haltigen Puffern.

3.4.4.6.1 EDTA-Behandlung

Die Ribosomen wurden in 2 verschiedenen EDTA enthaltenen Puffern (Zusammensetzung Tab. 10) suspendiert, 30 Min bei $4^{\circ}C$ gerührt, 120 Min mit $105000 \times g$ zentrifugiert, in einem Puffer ohne EDTA suspendiert und durch Zentrifugation

(20 Min, 25000 x g) von nicht gelösten Bestandteilen befreit. Dialyse gegen EDTA-Puffer kann die direkte EDTA-Behandlung ersetzen. Die so präparierten Ribosomen waren auf Grund weitgehender Degradation (Abb. 9) im zellfreien System inaktiv.

	EDTA-Puffer I	EDTA-Puffer II
EDTA	0,2 M	0,2 M
Tris ac pH 7,5	0,01 M	0,03 M
Mg ac	10^{-4} M	-
KCl	0,02 M	-
NH ₄ Cl	-	0,022 M

Tab. 10

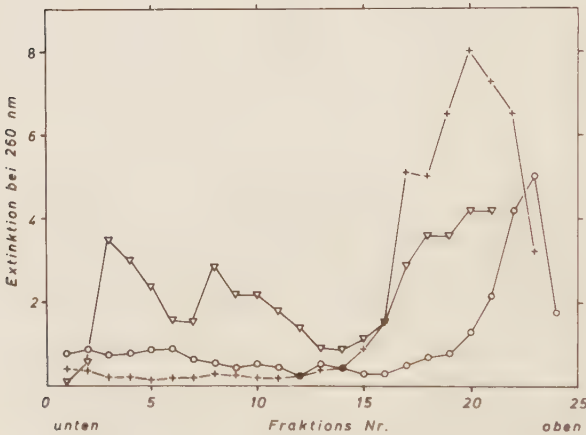


Abb. 9

Dichtegradienten-Zentrifugation EDTA-behandelter Ribosomen. Sucrose: 5-50 %. 3 h, 55000 x g.
 + — + RF_{roh} in EDTA-Puffer I suspendiert, sedimentiert, im gleichen Puffer ohne EDTA resuspendiert.
 o — o RF_{TMA I} bei 40°C 12 h dialysiert gegen EDTA-Puffer I.
 ∇ — ∇ RF_{roh} in EDTA-Puffer II suspendiert, sedimentiert, resuspendiert in Standardpuffer TMA IV.

Ähnliche Berichte zur Inaktivierung der Ribosomen durch EDTA sind in der Literatur mehrfach aufgeführt.

Leichtere Untereinheiten als erwartet erscheinen nach Behandlung von Polysomen mit EDTA in Gegenwart von Desoxycholat (einem Reagenz zur Lösung der Ribosomen vom endoplasmatischen Reticulum). Diese Reagenzien sollen den Verlust eines Teils der ribosomalen Strukturproteine verursachen (156). Als ein abdissoziiertes Strukturelement konnte die 5 S-RNS identifiziert werden (136). Allerdings wird auch über ein aktives Phenylalanin einbauendes System aus Untereinheiten berichtet, bei dem die Ribosomen vor der EDTA-Behandlung einer Präinkubation mit Poly U bei Proteinsynthesebedingungen unterzogen wurden (150). Auch eine temperaturabhängige Vorinkubation relativ inaktiver dissoziierter Ribosomen soll zu Aggregaten führen, die zur Poly-Phe-Synthese fähig sind (140). Daß die Temperatur für die Reassoziaton der Ribosomen keine unwesentliche Rolle spielen dürfte, kann außerdem aus Versuchen zur Rekonstitution von E. coli-Ribosomen aus ihren Protein- und RNS-Anteilen abgeleitet werden, die bei 40°C am vollkommensten ihre ursprüngliche Struktur wiedererlangen (202).

Über die Bedeutung der leichten Bestandteile aus Heferibosomen kann keine Aussage gemacht werden, da entsprechende Untersuchungen nicht durchgeführt wurden. Auch wurde das Verhalten der Ribosomen gegenüber EDTA unter anderen Bedingungen nicht weiter verfolgt.

3.4.4.6.2 Dialyse gegen Puffer niedriger Mg^{++} -Konzentration

Bei genügender Herabsetzung der Mg^{++} -Konzentration dissoziierten die Ribosomen auch ohne Zusatz von EDTA.

Es standen dafür folgende Puffer zur Verfügung:

	Dissoz.-Puffer I	Dissoz.-Puffer II
Tris ac pH 7,5	0,03 M	0,03 M
NH_4Cl	0,022 M	0,022 M
Mg ac	10^{-6} M	10^{-6} M
Merc	0,001 M	-

Die Ribosomen wurden entweder in dem jeweiligen Puffer suspendiert (1. Versuch) oder gegen diesen dialysiert (Versuche 2 - 4). Nach Sedimentation (2 h, 105000 x g) und Resuspension in Standard-TMA-Puffer wurden die Ribosomen im zellfreien System eingesetzt (Kap. 4.1.3) und mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation analysiert (Abb. 10 - 13).

In 10^{-6} M Mg^{++} -haltigem Puffer waren die Ribosomen nach 0,5 h noch nicht dissoziiert (Abb. 10). Erst 16-stündige Dialyse führte zum Zerfall in Untereinheiten (Abb. 11). Monosomen waren allerdings noch nachweisbar, von denen bei Dialyse gegen geringe Mengen Dissoz.-Puffer ein weiterer Anteil undissoziiert blieb (Abb. 12).

Bei Erhöhung der Mg^{++} -Konzentration aggregierten die Untereinheiten zu Monosomen, die sich zur DNS-abhängigen-RNS-gesteuerten Proteinsynthese aktiv erwiesen.

Nach einer 36-stündigen Dialyse erschienen neben einem Rest an Monosomen leichte Partikel, denen die Fähigkeit zur Reassoziaton verloren gegangen war (Abb. 13). Nach Berichten über Heferibosomen (137) soll im Verlauf einer Dialyse gegen 5×10^{-5} M Mg-Puffer die 60 S-Untereinheit weiter in ein 50 S-Partikel und 5 S-RNS aufspalten. Da die degradierten Ribosomen aus *Saccharomyces* keiner analytischen Ultrazentrifugation unterzogen wurden, kann zu diesen Befunden keine Stellung genommen werden.

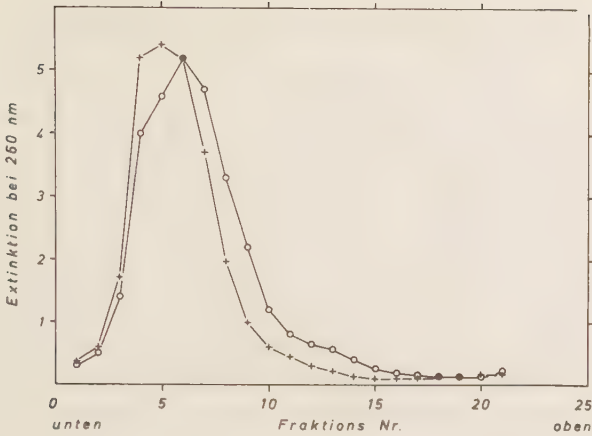


Abb. 10

1.Versuch: Dichtegradienten-Zentrifugation von Ribosomen.
3 h, 55000 x g. Sucrose: 5-50 %.
RF_{roh} in Dissoz.-Puffer I suspendiert, 0,5 h
bei 4°C gerührt (+ — +), sedimentiert, resus-
pendiert in TMA II (jedoch 0,02 M Mg) (o — o).

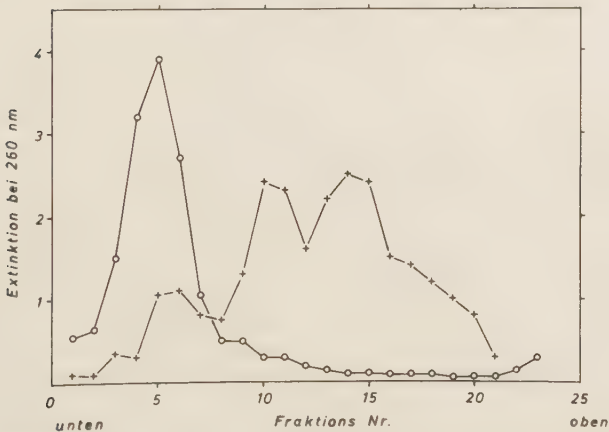


Abb. 11

2.Versuch: Dichtegradienten-Zentrifugation von Ribosomen.
3 h, 55000 x g. Sucrose: 5-50 %.
RF_{roh} (2 ml = 76 mg Ribosomen-Protein) 16 h bei
4°C dialysiert gegen 1 l Dissoz.-Puffer I
(+ — +), sedimentiert, resuspendiert in
TMA II-Puffer (o — o).

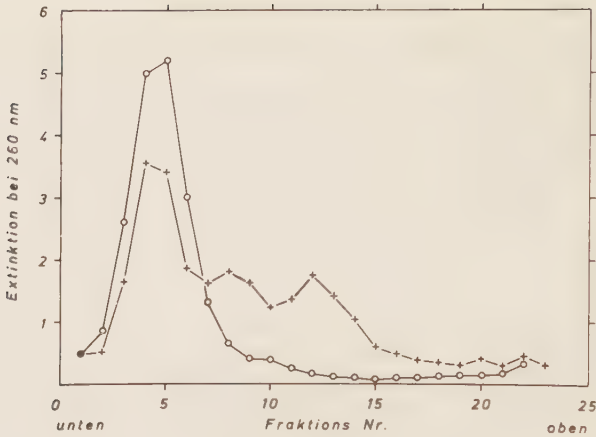


Abb. 12

3. Versuch: Dichtegradienten-Zentrifugation von Ribosomen.
 3 h, 55000 x g, Sucrose: 5-50 %.
 RF_{TMA IV} (2 ml = 70 mg Ribosomen-Protein) 16 h
 bei 4°C dialysiert gegen 0,5 l Dissoz.-Puffer II
 (+ — +), sedimentiert, resuspendiert in
 TMA IV-Puffer (o — o).

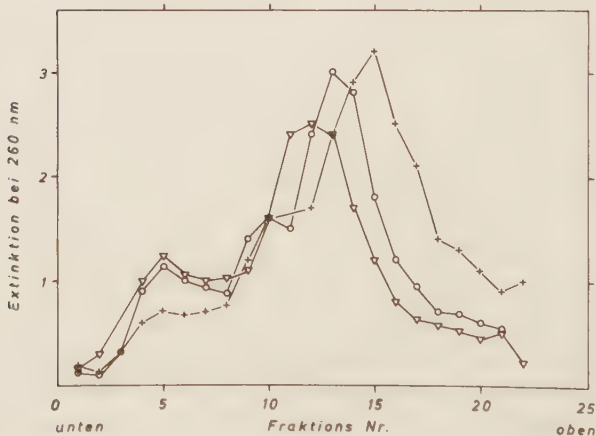


Abb. 13

4. Versuch: Dichtegradienten-Zentrifugation von Ribosomen.
 3 h, 55000 x g, Sucrose: 5-50 %.
 RF_{TMA IV} (2 ml = 70 mg Ribosomen-Protein) 36 h
 bei 4°C dialysiert gegen 1 l Dissoz.-Puffer II
 (+ — +), sedimentiert, resuspendiert in TMA II-
 Puffer (o — o) bzw. in TMA IV-Puffer mit
 0,015 M Mg (▽ — ▽).

3.4.4.6.3 Behandlung der KCl-haltigen Puffern

Die Vorinkubation der Ribosomen mit KCl (bis 1 M) fördert die Dissoziation und senkt die endogene Messenger-Aktivität. So wird von Rattenleberribosomen berichtet, die nach Präinkubation mit 750 mM KCl, Mg^{++} , energieliefernden Substanzen und Überstandsenzymen, nur noch 10 % der endogenen Aktivität besaßen, dagegen aber sehr aktiv im Poly U-System waren (159). Aktive hybride 80 S-Partikel ließen sich aus verschiedenen separierten Untereinheiten rekonstruieren, die durch KCl-Behandlung gewonnen waren (130). Für die Dissoziation scheint die Temperatur ein kritischer Faktor zu sein. Ein Temperaturschock von 28°C (130) oder 37°C (20) führt zur Spaltung der Ribosomen, die bei 4°C wieder aggregieren können (130) oder erst nach Erniedrigung der Ionenstärke 80 S-Partikel bilden (20). Über das Dissoziationsverhalten von Ribosomen in KCl-Lösungen gibt es zahlreiche weitere Arbeiten (40,62,63,151).

Die Spaltung der Ribosomen in KCl-Puffer erfolgte nach 2 Methoden:

1. Temperaturschock (37°C)
2. Dialyse

Es wurden die folgenden Puffer verwendet:

	KCl-Puffer I	KCl-Puffer II	KCl-Puffer III
KCl	0,85 M	1,0 M	0,6 M
Tris ac pH 7,5	0,03 M	0,03 M	0,05 M
Mg ac	0,01 M	10^{-6} M	0,014 M
NH ₄ Cl	0,022 M	-	-
Merc	0,001 M	0,001 M	0,02 M

Die Ribosomen, die für die Erwärmung vorgesehen waren, wurden einerseits nach BONANOU u. ARNSTEIN (20) mit KCl behandelt, andererseits in den KCl-Puffern I und II suspendiert, im Wasserbad bei 37°C für 5 Min gehalten und sofort in Eis gekühlt.

Die Dialyse (Versuche 1 - 3) von 0,5 ml Ribosomen-Suspension (in Standard-TMA-Puffer oder KCl-Puffer) erfolgte verschieden lange gegen 0,5 ml KCl-Puffer bei 4°C. Nach der Sedimentation wurden die Ribosomen in Standard-Puffer resuspendiert und im zellfreien System eingesetzt (Kap. 4.1.3). Alle Ribosomenpräparate wurden im Dichtegradientenfeld untersucht (Abb. 14 - 16).

Ein Temperaturschock wirkte sich bei Heferibosomen in allen Versuchen ungünstig auf ihre Aktivität im zellfreien System aus. Die Spaltung in Untereinheiten verlief unvollkommen oder es erfolgte bei zu geringer Mg^{++} -Konzentration eine völlige Degradation. Die Spaltprodukte assoziierten kaum zu Monosomen. Anders verhielten sich dialysierte Ribosomen. Aus den stets gebildeten Untereinheiten wurden in Standard-puffern mit Ausnahme des TMA III-Puffers (Abb. 16) vollständig Monosomen zurückgebildet (Abb. 14, 15), die im zellfreien System unter dem Angebot von Hefe- als auch Kalbs-thymus-DNS Proteine synthetisierten.

Trotz längerer Dialyse waren Reste undissoziierter Ribosomen nachzuweisen. Diese Beobachtung wurde auch von anderen Autoren mitgeteilt, die am Ribosom anhängende Polypeptidketten für die Stabilität verantwortlich machen. Durch Vorbehandlung mit Puromycin (130,228) oder Präinkubation der Polysomen unter Proteinsynthesebedingungen (62) lassen sich vorher nicht spaltbare Ribosomen in aktive Untereinheiten dissoziieren. Allerdings sollen die Untereinheiten durch Fraktionierung im Gradientenfeld von Sucrose inaktiviert werden (151). Gleiches wurde an Ribosomen aus *Saccharomyces* beobachtet (102). Da nach Zugabe des Zentrifugationsüberstandes Bakterienribosomen wieder normal arbeiten (161), kann vermutet werden, daß bei der Zentrifugation durch Sucrose Faktoren verloren gehen, die für eine akurate Translation notwendig sind.

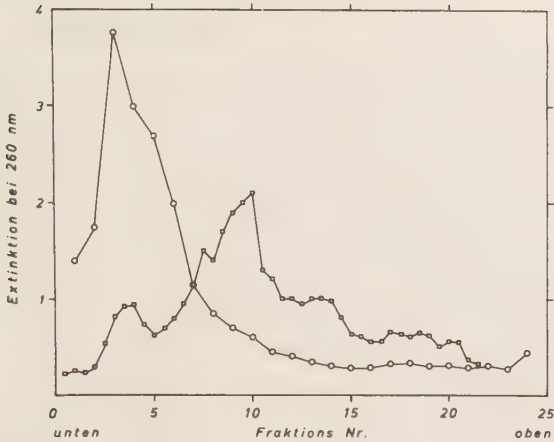


Abb. 14

1.Versuch: Dichtegradienten-Zentrifugation von Ribosomen.
 3 h, 55000 x g, Sucrose: 5-50 %.
 RF_{TMA II} (35 mg Ribosomen-Protein/ml) gegen KCl-
 Puffer III 16 h dialysiert (□—□), sedimentiert,
 in TMA II-Puffer resuspendiert (o—o).

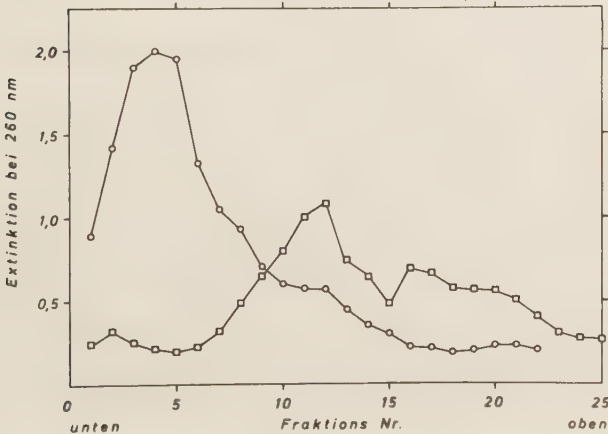


Abb. 15

2.Versuch: Dichtegradienten-Zentrifugation von Ribosomen.
 3 h, 55000 x g, Sucrose: 5-50 %.
 RF_{roh} in KCl-Puffer III suspendiert, gegen KCl-
 Puffer III 16 h dialysiert (□—□), sedimentiert,
 in TMA II-Puffer resuspendiert (o—o).

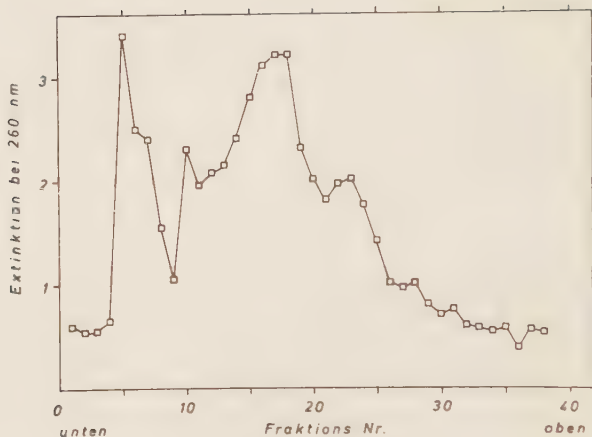


Abb. 16

3. Versuch: Dichtegradienten-Zentrifugation von Ribosomen.
3 h, 55000 x g, Sucrose: 5-50 %.
RF_{roh} in KCl-Puffer III suspendiert, gegen KCl-Puffer III 40 h dialysiert, sedimentiert, in TMA III-Puffer resuspendiert (□ — □).

3.4.4.7 Einstellung der Ribosomenkonzentration

Die Ribosomenkonzentration wird in mg Ribosomen-Protein pro ml Lösung angegeben. Die Menge an Protein ist aus dem bestimmbareren Anteil der rRNS zu ermitteln: 50 μ g Nucleinsäure haben bei 260 nm eine Extinktion von 1,2. BRUNNING (28) gibt für die Zusammensetzung von Heferibosomen 54 % RNS und 44 % Protein an, übereinstimmend fand HORSTMANN (98) in Ribosomen aus *Saccharomyces cerevisiae* 52,3 % RNS und 46,6 % Protein. Abweichend von den Angaben der beiden Autoren ist nach BIELKA (17) der Gehalt der Ribosomen von *S. cerevisiae* an RNS 40 % und an Protein 60 %.

In dieser Arbeit wurde das ribosomale Protein aus der photometrisch ermittelten RNS-Konzentration berechnet unter Benutzung der Zahlenwerte von HORSTMANN (98).

3.4.4.8 Zusammenfassung

Die Struktur der Ribosomen erwies sich bei verschiedenen Reinigungsverfahren sehr labil. EDTA-Behandlung, Inkubation mit RNase, zu lange andauernde Dialyse gegen Puffer niedriger Mg^{++} -Konzentration und Erhitzen in KCl-Puffer führten zu irreversiblen Schädigungen der Ribosomen. Die Präinkubation mit energieliefernden Substanzen als auch eine Waschung mit NH_4Cl -haltigen Puffern konnten die Aktivität und die Stimulierung durch Poly U nicht wesentlich verbessern und wurden daher zur Reinigung nicht herangezogen. Als erfolgreich für den Einsatz im DNS-abhängigen System haben sich Ribosomen erwiesen, die gegen Puffer niedriger Mg^{++} -Konzentration oder hohen KCl-Gehaltes dialysiert wurden. Für ein Poly U-abhängiges System wurden im allgemeinen in Standard-TMA-Puffer gewaschene Ribosomen verwendet.

3.5. Haltbarkeit der zellfreien Fraktionen

Der Aktivitätsverlust isolierter Ribosomen und Enzyme machte eine rasche Verarbeitung erforderlich. Trotz sofortigen Einfrierens der Fraktionen bei $-35^{\circ}C$ und nur einmaligen Auftauens bis zum Gebrauch waren die Präparate mit wenigen Ausnahmen lediglich über wenige Tage zur Proteinsynthese brauchbar (Abb. 17).

In einer anderen Arbeitsgruppe bewährte sich das Einfrieren in flüssigem Stickstoff zur Konservierung von Heferibosomen (87). Möglicherweise könnte auch eine Trocknung über P_2O_5 oder eine Gefriertrocknung, die bei E. coli-Ribosomen zur Aktivitätserhaltung über 5 Monate geführt hat (105,196), bei Heferibosomen erfolgreich sein.

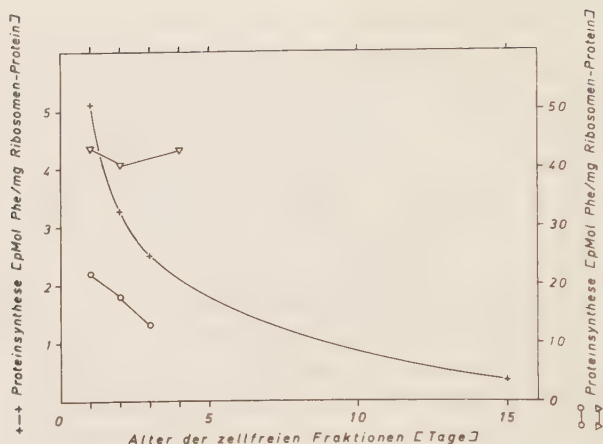


Abb. 17

Phenylalanineinbau im zellfreien System in Abhängigkeit vom Alter der zellfreien Extrakte. Aufbewahrung bei -35°C . Inkubation 60 Min bei 30°C .

+ — +: System aus Protoplasten präpariert.

Ein Ansatz zu 1,1 ml enthielt:

in mg: Ribosomen-Proteine: 0,94; Enzyme: 1,8;

tRNS: 0,25; Poly U: 0,1;

in μMol : ATP: 1; GTP: 0,57; 3-PG: 8; Mg ac: 11;

Tris ac pH 7,5: 11; Merc: 1,1; NH_4Cl : 24,2;

^{14}C -Phe (408 G/Mol): 2,45 nMol.

o — o und v — v: System aus homogenisierten Zellen.

Ein Ansatz zu 0,6 ml enthielt:

in mg: Ribosomen-Proteine: 2,7; Enzyme: 1,1;

tRNS: 0,125; Poly U: 0,05; PEP-Kinase: 0,01;

in μMol : ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85; Mg ac: 13;

Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6; NH_4Cl : 13,2;

^{14}C -Phe (48,5 G/Mol): 0,01.

Der Haltbarkeit zellfreier Komponenten kommt bei mikrokalorimetrischen Experimenten eine besondere Bedeutung zu, da bis zum Temperatúrausgleich wenigstens 1 h erforderlich ist. Bei 30°C erlitten Ribosomen und Enzyme während dieser Zeit so weitgehende Schädigungen (Abb.18), daß Untersuchungen über den Proteinsyntheseablauf nicht sinnvoll erschienen. Bei 10°C als auch bei 20°C konnten dagegen nach einstündiger Temperierung der getrennten Komponenten keine

Aktivitätsverluste mehr festgestellt werden (Tab. 11). Somit bot sich für die Proteinsynthese im Mikrokalorimeter eine Inkubationstemperatur von 20°C an, obgleich die Geschwindigkeit der Proteinsynthese bei dieser Temperatur naturgemäß kleiner ist als bei 30°C.

Inkubation	60 Min, 30°C		60 Min, 20°C		90 Min, 20°C		150 Min, 10°C	
Temperierung	-	30 Min 30°C	-	60 Min 20°C	-	60 Min 20°C	-	60 Min 10°C
pMol Phe/ mg Ribosomen- Protein	44,6 60	3,03 6,6	11,8	13,3	12,7	13	9,65	9,4

Tab. 11: Phenylalanineinbau bei verschiedenen Inkubationstemperaturen mit unterschiedlich temperierten zellfreien Fraktionen.

Ribosomen, energieliefernde Substanzen und Enzyme mit restlichen essentiellen Faktoren wurden getrennt temperiert und erst zur Inkubation zusammengegeben. Ein Inkubationsansatz von 0,6 ml enthielt:
in mg: Ribosomen-Proteine: 1,75; Enzyme: 1,2;
tRNS: 0,125; Poly U: 0,05; PEP-Kinase: 0,01;
in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85; Mg ac: 14;
Tris ac pH 7,5: 18; NH_4Cl : 13,2; Merc: 0,6;
 ^{14}C -Phe (48,5 C/Mol): 0,01.

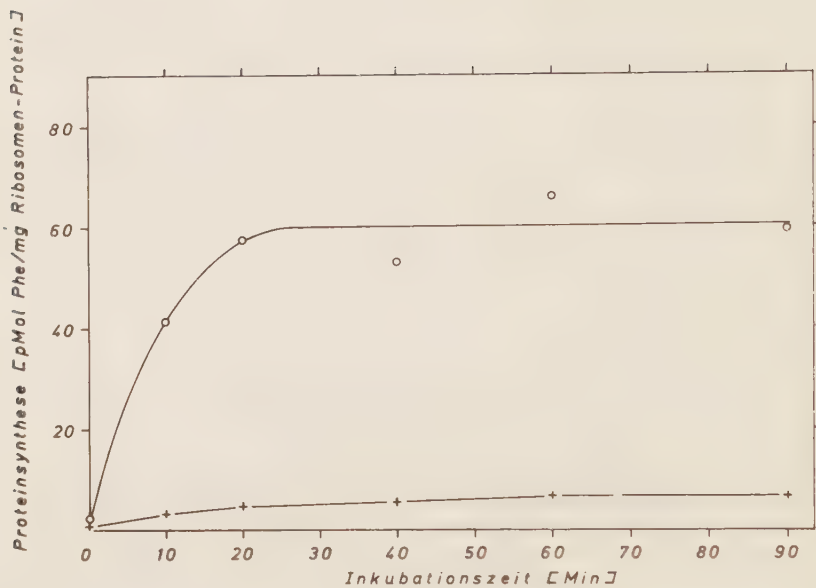


Abb. 18

Zeitlicher Verlauf des Einbaus von Phenylalanin mit temperierten und nicht temperierten zellfreien Extrakten.

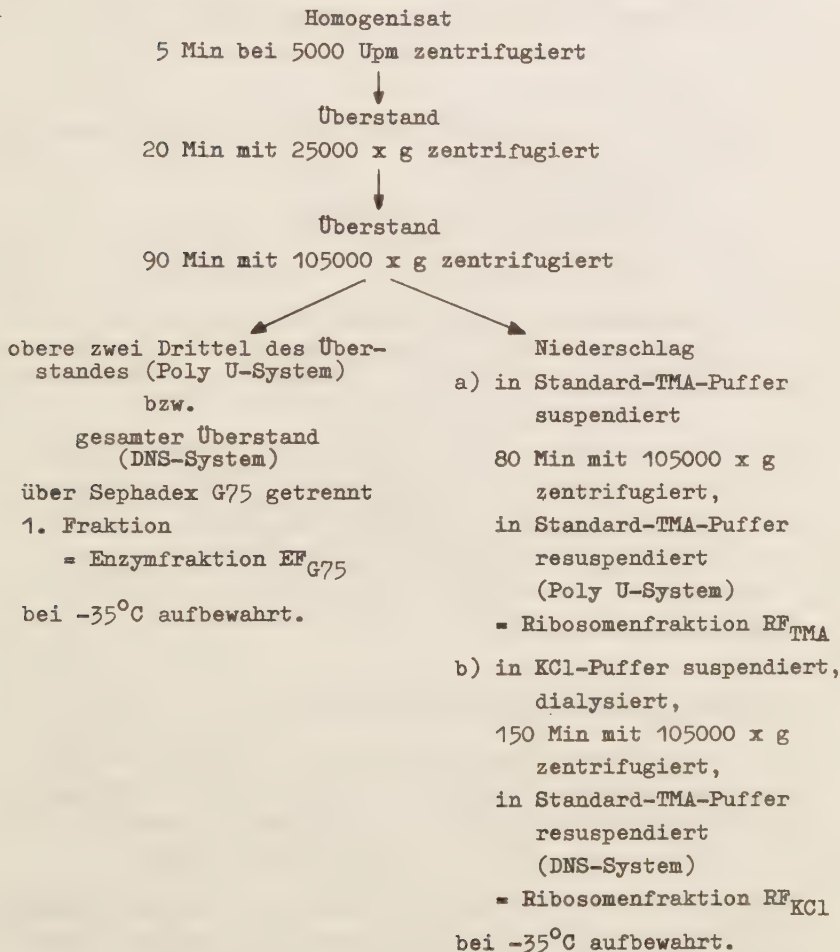
Inkubation bei 30°C in 0,6 ml Ansätzen. Die Zusammensetzung entsprach der unter Tab. 11.

o — o: nicht temperiert

+ — +: Ribosomen, energieliefernde Substanzen, Enzyme mit restlichen essentiellen Faktoren getrennt 30 Min bei 30°C temperiert.

3.6 Übersicht eines Verfahrens zur Gewinnung zellfreier Fraktionen

Hefezellen mit Glasperlen homogenisiert
Glasperlen auf Sinterglasfritte 17G2 abgetrennt



Die Übersicht gibt die Präparationen wieder, nach denen in den folgenden Kapiteln verfahren wurde.

3.7 Inkubationsbedingungen

3.7.1 Bereitung des Inkubationsansatzes

Die bei -35°C eingefrorenen gereinigten Überstandsenzyme und Ribosomen sowie alle weiteren zur Proteinsynthese benötigten Lösungen wurden in lauwarmem Wasser aufgetaut und in sterile Zentrifugenröhrchen von 10 ml Inhalt im Eisbad einpipettiert.

Ein Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

- Ribosomensuspension,
- Enzymfraktion,
- Poly U-Lösung in Standardpuffer,
- tRNS-Lösung in Standardpuffer,
- energieliefernde Substanzen in Standardpuffer,
- markiertes Phenylalanin in Standardpuffer.

Ein DNS-abhängiges System enthielt anstelle von Poly U:

- DNS-Lösung in Standardpuffer,
- eine Lösung von UTP, CTP, GTP in Standardpuffer,
- eine Lösung von 19 inaktiven Aminosäuren in Standardpuffer.

Als Enzymfraktion wurde der gesamte Überstand der Zentrifugation mit $105000 \times g$ verwendet.

Alle Inkubationsansätze wurden mit Standardpuffer auf in der Regel 0,6 ml gebracht und an den Wandungen hängende Tröpfchen durch kurzes Zentrifugieren bis 1500 Upm der übrigen Lösung zugefügt.

3.7.2 Inkubationszeit und -temperatur

Die Inkubationsansätze wurden gut mit Wattestopfen verschlossen und bei verschiedenen Temperaturen geschüttelt. Im Abstand von 10 oder 20 Minuten wurde in jeweils einem Ansatz die Proteinsynthese gestoppt.

Wie aus Abb. 19 zu ersehen ist, hatte ein bei 30°C inkubiertes System nach 30 Min bereits seine maximale Proteinsyntheseleistung erreicht, während bei 20°C und 10°C sogar nach 90 Min noch ein Anstieg des Phenylalanin-Einbaus zu beobachten war.

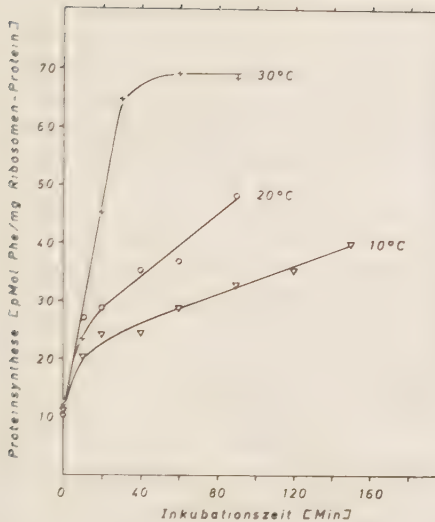


Abb. 19

Zeitlicher Verlauf des Phenylalanin-Einbaus in Proteine bei verschiedenen Inkubationstemperaturen.

Ein Reaktionsansatz enthielt in 0,6 ml:

in mg: Ribosomen-Proteine: 2; Enzyme: 1,05;
tRNS: 0,125; Poly U: 0,05; PEP-Kinase: 10;
in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85; Mg ac: 14;
Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6; NH_4Cl : 13,2;
 ^{14}C -Phe (48,5 C/Mol): 0,01.

Die Synthese der Proteine erfolgte im allgemeinen in 60 Min bei 30°C, nur die mikrokalorimetrischen Versuche wurden bei 20°C durchgeführt.

3.7.3 Unterbrechen der Proteinsynthese und Waschen des Niederschlages

Nach beendeter Inkubation wurden die Ansätze mit entmineralisiertem Wasser auf 2 ml aufgefüllt und im Eisbad alle Proteine und a-tRNS-Moleküle mit 2 ml 10%iger Trichlor-essigsäure (TCA) ausgefällt. Zum Austausch von lediglich am Protein adsorbiertem ^{14}C -Phenylalanin enthielt die TCA noch 2 mMol/l inaktives Phenylalanin. Aus den Niederschlägen

ließ sich a-tRNS durch 20 Min Kochen auf dem Wasserbad herauslösen (Tab. 12). Nur zur Bestimmung von Phe-tRNS wurde der Niederschlag ausschließlich mit kalter 5%iger TCA dreimal in der Zentrifuge gewaschen. Das Waschen der gekochten Niederschläge erfolgte durch Zentrifugation oder auf Sartorius-Membranfiltern SM 11006025.

Waschen des Niederschlages in 5%iger TCA	Ipm des Niederschlages
3 x kalt	37000
10 Min gekocht, 3 x kalt	4200
2 x je 10 Min gekocht, 2 x kalt	3500
3 x je 10 Min gekocht, 1 x kalt	3500
30 Min gekocht, 3 x kalt	4000

Tab. 12: Einbau von ^{14}C -Phenylalanin in TCA-gefällte Niederschläge nach verschiedenen Waschmethoden.

3.7.4 Messung und Auswertung der Radioaktivität

Die gewaschenen Niederschläge oder getrockneten Membranfilter wurden in Scintillationsfläschchen mit 10 ml Scintillationsflüssigkeit übergossen und die Radioaktivitäten im Flüssigkeitsscintillationszähler gemessen.

Der Quencheffekt betrug bei zentrifugierten Niederschlägen 20 % und bei getrockneten Membranfiltern 30 % der Strahlung. Dieser Verlust wurde bei der Berechnung des umgesetzten Phenylalanins berücksichtigt. Bei 100%iger Zähl- ausbeute entsprechen $2,22 \times 10^{12}$ Ipm einem Curie.

Aus der spezifischen Radioaktivität der angebotenen Aminosäure und aus der Menge des im Inkubationsansatz vorgelegten Ribosomen-Proteins errechnet sich die in synthetisiertem Protein gebundene Aminosäure.

3.7.5 pH-Wert

Wie alle enzymkatalysierten Reaktionen ist auch die Proteinsynthese in vitro von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig. Bei einem pH-Wert von 7,5 erreichte das System seine optimale Leistungsfähigkeit (Abb. 20).

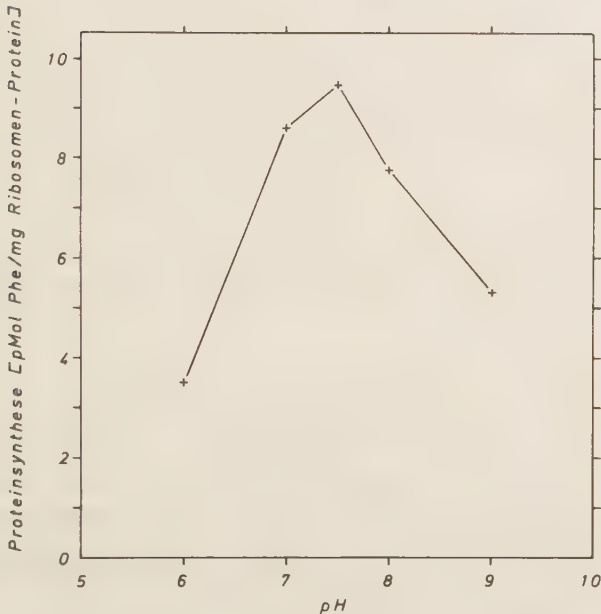


Abb. 20

Abhängigkeit des Phenylalanin-Einbaus vom pH-Wert des Inkubationsansatzes.

Inkubation 60 Min bei 30°C.

Ansätze zu 1 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine: 0,9; Enzyme: 1,8;
tRNS: 0,25; Poly U: 0,1;

in μ Mol: ATP: 1; GTP: 0,57; 3-PG: 8; Mg ac: 10;
Tris ac pH 7,5: 10; Merc: 1; NH_4Cl : 22;
 ^{14}C -Phe (408 C/Mol): 2,45 nMol.

3.7.6 Magnesium-Konzentration

Die Proteinbiosynthese *in vitro* ist in besonderem Maße von der gewählten Mg^{++} -Konzentration abhängig. Das *Saccharomyces*-System zeigt für die Poly U-abhängige Poly Phe-Synthese ein ausgeprägtes Aktivitätsmaximum bei 20 mMol Mg^{++}/l und ein flaches Maximum bei 8,5 mMol Mg^{++}/l (Abb. 21).

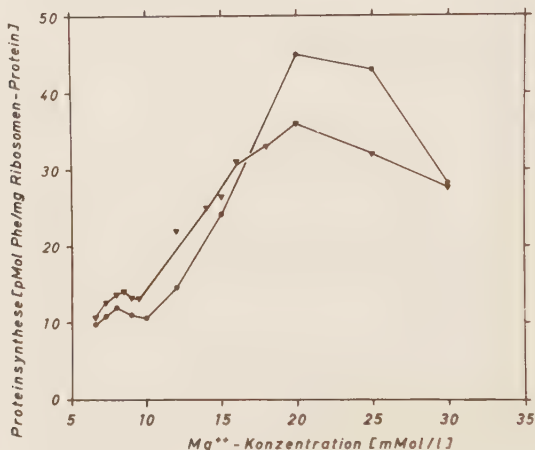


Abb. 21

Abhängigkeit des Phenylalanin-Einbaus von der Magnesium-Konzentration.

Inkubation 60 Min bei 30°C. Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine: 1,78; Poly U: 0,05;
 Enzyme: EF_{G75} (▼ — ▼): 1,4; EF dialys.
 1.Vers. Kap. 3.4.3.3 (● — ●): 1,8;
 tRNS: 0,125; PEP-Kinase: 0,0125;
 in μ Mol: ATP: 1,48; GTP: 1,44; PEP: 6,05;
 Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6; NH₄Cl: 13,2;
¹⁴C-Phe (48,5 C/Mol): 0,01; Mg ac: 4 - 20.

Eine ähnliche Aktivitätsverteilung der durch künstliche Polynucleotide gesteuerten Polypeptidsynthese wurde im *Escherichia coli*-System gefunden (108,139). Es konnte gezeigt werden, daß die Proteinsynthese bei niedriger Magnesiumkonzentration an die Gegenwart von Initiator-tRNS

(FMet-tRNS_{FMet}) oder eines Formyldonators gebunden ist, während ein höherer Magnesiumgehalt die FMet-tRNS_{FMet} bzw. den Formyldonator ersetzt. Im letzteren Fall läßt sich die Proteinsynthese durch Zugabe von FMet-tRNS_{FMet} nicht weiter steigern.

Die gleiche Ursache kann für das vorliegende Saccharomyces-System angenommen werden. Da dem Poly U-abhängigen System keine Initiator-tRNS angeboten wurde, ist eine höhere optimale Magnesiumkonzentration zu erwarten. Die Reaktionen, die bevorzugt bei 8,5 mMol Mg⁺⁺/l ablaufen, deuten auf Proteinsynthese hin, die mit endogen vorhandener Initiator-tRNS gestartet wird. Dieser Anteil ist bezogen auf die Gesamtproteinsynthese gering.

Versuche zur Proteinsynthese wurden im Saccharomyces-System bei 23,3 und 8,5 mMol Mg⁺⁺/l durchgeführt, ohne daß nennenswerte Unterschiede zwischen beiden Systemen festgestellt werden konnten.

3.7.7 Ribosomen-Konzentration

Zur Ermittlung der Abhängigkeit des Phenylalanin-Einbaus von der Ribosomen-Konzentration wurde das Saccharomyces-System bezüglich aller übrigen essentiellen Substanzen gesättigt und bei den beiden optimalen Mg⁺⁺-Konzentrationen (23,3 mMol Mg⁺⁺/l und 8,5 mMol Mg⁺⁺/l) getestet (Abb. 22).

Danach war das System bei der höheren Mg⁺⁺-Konzentration mit über 40 mg Ribosomen-Protein pro Ansatz gesättigt. Ein linearer Anstieg des Phenylalanin-Einbaus konnte mit steigender Menge an Ribosomen-Protein in unteren Konzentrationsbereichen (1 - 3 mg Ribosomen-Protein/Ansatz) sowohl bei 23,3 als auch bei 8,5 mMol Mg⁺⁺/l festgestellt werden. In einigen Fällen wurde bei überreichlichem Ribosomen-Angebot eine Hemmung der Proteinsynthese beobachtet.

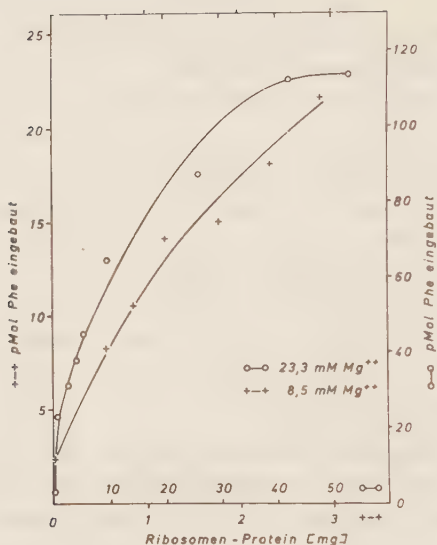


Abb. 22

Phenylalanin-Einbau in Abhängigkeit von der Konzentration an Ribosomen-Protein.

Inkubation 60 Min bei 30°C . Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine: 0 - 3 (+ — +),
0 - 53 (o — o);

Enzyme: 1,6; tRNS: 0,125; Poly U: 0,05;

PEP-Kinase: 0,01;

in μMol : ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85;

Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6; NH_4Cl : 13,2;

^{14}C -Phe (48,5 G/Mol): 0,01;

Mg ac: (+ — +): 5,1; (o — o): 14.

3.7.8 Konzentration der Überstandsenzyme

Die über Sephadex G75 gereinigten Überstandsenzyme wurden unter Konstanthaltung der Konzentration aller anderen Substanzen in unterschiedlichen Mengen dem Inkubationsansatz hinzugefügt. Das in Abb. 23a und 23b dargestellte Resultat zeigt, daß 1,5 mg Überstandsproteine pro Ansatz ausreichen, um das in vitro-System (bei 8,5 als auch 23,3 mM Mg^{++} /l) an Enzymen zu sättigen.

Eine Hemmung des Phenylalanin-Einbaus war dann zu beobachten, wenn die Enzymkonzentration 2 mg/Ansatz überstieg.

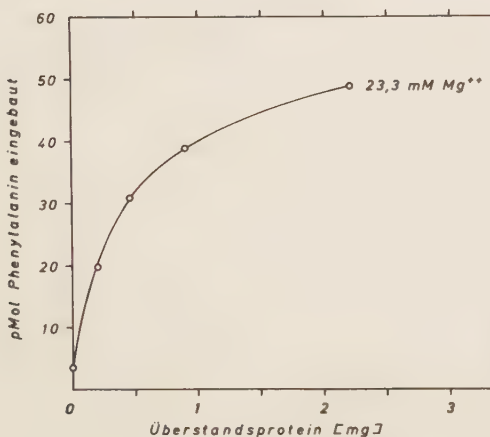


Abb. 23a

Phenylalanin-Einbau in Abhängigkeit von der Konzentration an Überstandsprotein.

Inkubation 60 Min bei 30°C. Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Protein: 1,8; Poly U: 0,05;
tRNS: 0,125; Überstandsprotein: 0 - 2,2;
PEP-Kinase: 0,01;

in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 5,95; Mg ac: 14;
Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6; NH_4Cl : 13,2;

^{14}C -Phe (5 C/Mol): 0,1.



Abb. 23b

Phenylalanin-Einbau in Abhängigkeit von der Konzentration an Überstandsprotein.

Inkubation 60 Min bei 30°C. Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Protein: 2,4; Poly U: 0,05;
tRNS: 0,125; Überstandsprotein: 0 - 2,75;
PEP-Kinase: 0,0125;

in μ Mol: ATP: 1,48; GTP: 1,44; PEP: 6,05; Mg ac: 5,1;
Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6; NH_4Cl : 13,2;

^{14}C -Phe (48,5 C/Mol): 0,01.

3.7.9 Poly U-Konzentration

Eine Sättigung des Systems an Poly U wurde im allgemeinen mit 0,05 mg/Ansatz erreicht. Dies galt in Gegenwart von 8,5 als auch 23,3 mM Mg^{++} /l (Abb. 24).

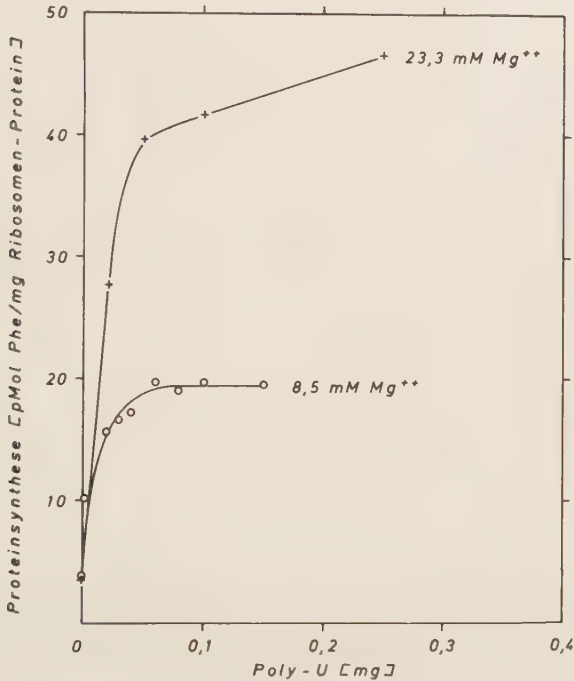


Abb. 24

Phenylalanin-Einbau in Abhängigkeit von der Poly U-Konzentration.

Inkubation 60 Min bei 30°C. Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

- + — +: in mg: Ribosomen-Protein: 1,7; Enzyme: 1,16;
tRNS: 0,125; PEP-Kinase: 0,01;
in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85; Mg ac: 14;
Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6; NH_4Cl : 13,2;
 ^{14}C -Phe (5 C/Mol): 0,1.
- o — o: in mg: Ribosomen-Proteine: 1,44; tRNS: 0,125;
Enzyme: 1,65; PEP-Kinase: 0,0125;
in μ Mol: ATP: 1,48; GTP: 1,44; PEP: 6,05; Mg ac: 5,1;
Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6; NH_4Cl : 13,2;
 ^{14}C -Phe (48,5 C/Mol): 0,01;
Poly U: 0 - 2,5 mg.

3.7.10 tRNS-Konzentration

Für den Phenylalanin-Einbau besteht in Abhängigkeit von der tRNS-Konzentration bei 0,25 mg tRNS/Ansatz ein ausgeprägtes Maximum (Abb. 25). Eine Erhöhung der tRNS-Konzentration auf 3 mg hatte eine Hemmung der Proteinsynthese um nahezu 50 % zur Folge.

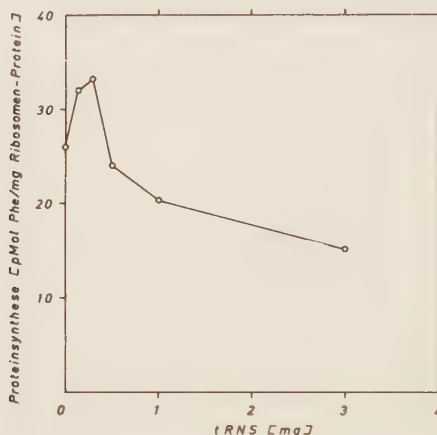


Abb. 25

Phenylalanin-Einbau in Abhängigkeit von der tRNS-Konzentration.

Inkubation 60 Min bei 30°C. Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine: 2,13; Poly U: 0,05;

Enzyme: 1,52; PEP-Kinase: 0,01; tRNS: 0-3;

in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85;

Mg ac: 14; Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6;

NH_4Cl : 13,2;

^{14}C -Phe (5 C/Mol): 0,1.

Die Hemmwirkung deacylierter tRNS wurde bereits im E. coli (183)- als auch im Hefe-System (10,125) beobachtet. Die Bindung von Phe-tRNS an Heferibosomen ließ sich durch deacylierte tRNS bis zu 90 % hemmen. Demgegenüber sprechen mit Phe-tRNS vorinkubierte Ribosomen in Gegenwart von GTP und Aminosäure-Transferfaktoren nicht auf unbeladene tRNS an (10).

Die in dieser Arbeit aus *Saccharomyces* gewonnene Überstandsfraktion konnte an Sephadex G75 nicht in Proteine und RNS getrennt werden, so daß zelleigene tRNS im in vitro-System vorhanden sein dürfte. Ein größeres zusätzliches Angebot an tRNS wirkt sich daher ungünstig auf die Proteinsynthese aus.

3.7.11 Energielieferndes System

Die Versuche an sämtlichen zellfreien Systemen wurden unter Sättigung an ATP und GTP durchgeführt. Als ATP regenerierende Substanzen wirkten PEP zusammen mit PEP-Kinase oder 3-PG, das jedoch um 25 % weniger aktiv war.

Als energieliefernde Substanzen dienten folgende Mischungen:

I: ATP = 60 mg	Zu 4 ml TMA III-Puffer gelöst.
GTP = 60 mg	Mit konz. NH_4OH auf pH 7,5 ein-
PEP = 100 mg	gestellt, mit 0,1 ml PEP-Kinase
	(Kristallsuspension 10 mg/ml)
	versetzt. Bei 40°C aufbewahrt.

II: ATP = 60 mg	Zu 5 ml TMA II-Puffer gelöst.
GTP = 60 mg	Mit konz. NH_4OH auf pH 7,5 ein-
PEP = 100 mg	gestellt, mit 0,1 ml PEP-Kinase
	versetzt. Bei 40°C aufbewahrt.
Mg $\text{ac} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ = 171,4 mg	

III: ATP = 60 mg	Zu 5 ml TMA II-Puffer gelöst.
GTP = 60 mg	Mit konz. NH_4OH auf pH 7,5 ein-
3-PG = 105 mg	gestellt. Bei -35°C aufbewahrt.
Mg $\text{ac} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ = 171,4 mg	

3.7.12 Radioaktive Aminosäure

^{14}C -Phenylalanin (spezifische Aktivität 378 bzw. 408 C/Mol) wurde in salzsaurer Lösung bezogen und wurde vor Gebrauch auf pH 7,5 mit NH_4OH eingestellt. Mit inaktiver L-Phenylalaninlösung wurde sodann die Konzentration auf 0,2 bzw. 2 μMol Phe/ml heraufgesetzt und gleichzeitig die spezifische Radioaktivität auf 48,5 bzw. 5 C/Mol gesenkt.

3.7.13 Zusammenfassung der Inkubationsbedingungen

Die Proteinbiosynthese wurde im allgemeinen in 0,6 ml Reaktionsgemischen durchgeführt, wobei die Inkubation bei 30°C und pH 7,5 unter Schütteln in 60 Min erfolgte.

Typische Inkubationsansätze enthielten:

- 1,5-2 mg Ribosomen-Proteine
(Ribosomen in Standardpuffer gewaschen)
- 1-1,5 mg Enzyme
(Überstandsfraktion über Sephadex G75 aufgetrennt)
- 0,125 mg tRNS aus Hefe
- 0,01 mg PEP-Kinase
- 1,18 μ Mol ATP
- 1,15 μ Mol GTP
- 4,85 μ Mol PEP
- 18 μ Mol Tris ac
- 13,2 μ Mol NH_4Cl
- 0,6 μ Mol 2-Mercaptoäthanol
- 14 bzw. 5,1 μ Mol Mg ac
- 0,01 μ Mol (48,5 C/Mol) bzw. 0,1 μ Mol (5 C/Mol) ^{14}C -Phe
- 0,05 mg Poly U
oder wechselnde Mengen DNS (Hefe, Kalbsthymus,
T4-Phage)
- zusammen mit 0,022 μ Mol UTP
0,023 μ Mol CTP
je 0,025 μ Mol von 19 inaktiven
Aminosäuren.

Das DNS-abhängige System wurde mit der gesamten über Sephadex G75 gereinigten Enzymfraktion präpariert. Zur Auswertung wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von 10%iger TCA gestoppt, der Niederschlag 20 Min im Wasserbad gekocht, ausgewaschen und die Radioaktivität gemessen.

4. VERSUCHE ZUR FUNKTION DES ZELLFREIEN SYSTEMS

4.1 Die Leistung des zellfreien Systems

4.1.1 Das Poly C- und Poly A-abhängige System

Ein zellfreies System aus *Saccharomyces* arbeitete mit Poly C und Poly A sehr viel schlechter als mit Poly U (Tab. 13). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit entsprechenden Untersuchungen im *Escherichia coli*-System (144). Danach liegt eine Erklärung in der helixartigen Sekundärstruktur bestimmter synthetischer Polynucleotide (wie für Poly A gezeigt wurde), denn nur einsträngige Polynucleotide können Messengerfunktion übernehmen.

synthetischer Messenger	pro mg Ribosomen-Protein eingebaute Aminosäure
Poly U	10 - 20 pMol Phenylalanin
Poly C	1,54 pMol Prolin
Poly A	0,2 pMol Lysin

Tab. 13: Einbau radioaktiver Aminosäuren in Proteine, die unter Standardbedingungen durch verschiedene synthetische Messenger codiert wurden.

4.1.2 Das Poly U-abhängige System

4.1.2.1 Essentielle Faktoren und Inhibitoren

Die Polyphenylalaninsynthese wurde bei 30°C - in einem Versuch bei 20°C - durchgeführt. Um Unterschiede zwischen den mit und ohne Initiator-tRNA ablaufenden Reaktionen aufzuzeigen, enthielten die Reaktionsgemische unterschiedliche Mengen an Mg^{++} -Ionen.

Die Tabellen 14a und b geben eine Übersicht über einige Versuche, in denen der Phenylalanin-Einbau kompletter Systeme und deren Abhängigkeiten von essentiellen Faktoren und Inhibitoren gemessen wurde.

Die in diesen Versuchen eingesetzten Ribosomen waren in Standardpuffer gewaschen.

	A		B				
Objekt	Saccharomyces Stamm 211						
Züchtungsbedingung	leichtes Schütteln				starkes Belüften		
Inkubations- temperatur	30°C				20°C	30°C	
Mg ⁺⁺ -Konz. (mMol/l.)	8,5				12	23,3	23,3
Komplettes System pMol Phe/mg Ribosomen-Protein	33,1 = 100 %	26,6 = 100 %	19,7 = 100 %	31,4 = 100 %	28,3 = 100 %	60,2 = 100 %	22,6 = 100 %
minus Poly U	27 %		10 %	22 %	46 %	5 %	94 = 100 %
minus energielie- ferndes System	1 %	2 %	11 %	8 %	14 %	2 %	
minus GTP	89 %	92 %	95 %			32 %	
minus tRNS	90 %		89 %			37 %	
minus Enzyme	2 %	27 %	3 %		4 %	2 %	
minus Ribosomen	0 %	1 %	12 %	3 %	11 %		
plus 19 inaktive Aminosäuren	75 %			86 %		25 %	69 %
plus Puromycin							90 %
plus Chloramphenicol							

Tab. 14a

Tab. 14a/b: Zellfreie von Poly U stimulierte Protein synthetisierende Systeme aus Saccharomyces und Escherichia coli. Inkubation 60 Min bei 30°C. Ansätze zu 0,6 ml (A u. B) bzw. 0,5 ml (C) enthielten:

A: Ribosomen-Proteine		Enzyme	
RF TMA III:	1,4 - 1,8 mg	RF G75, TMA III:	1,5 - 2 mg
RF TMA II:	1,2 - 1,4 mg	EF G75, TMA II:	1,2 - 1,6 mg
RF TMA:	4,5 mg	EF DEAE	2,5 mg

Zum Vergleich wurde die Proteinsynthese in einem E. coli-System verfolgt, das nach TRAUB u. ZILLIG (200) präpariert worden war.

Das verwendete Poly U-Präparat wurde mit Hilfe der Dichtegradienten-Zentrifugation auf Homogenität untersucht (Abb. 29). Interessant sind in diesem Zusammenhang vor kurzem veröffentlichte Untersuchungen (32) über eine Korrelation der Sedimentationskonstanten verschiedener Poly U-Präparate mit ihrer Aktivität im zellfreien System (s. Kap. 4.2.4).

Die Stimulierung durch Poly U war in einem System mit dissoziierten und reassozierten Ribosomen (Kap. 3.4.4.6.2) weniger ausgeprägt (Tab. 15) als mit Ribosomen, die mit Standardpuffer gewaschen wurden.

	Proteinsynthese	
	pMol Phe/mg Ribosomen-Protein	% Einbau
Komplettes System	48,1	100
minus Poly U		42
minus energielieferndes System		27
minus Ribosomen		9
minus Enzyme		31

Tab. 15: Zellfreies System mit reassozierten Ribosomen-Untereinheiten.

Inkubation 60 Min bei 30°C.

Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine (RF gegen niedrige Mg⁺⁺-Konzentration dialysiert und reassoziert. S. Kap. 3.4.4.6.2, 3. Versuch): 1,56;
Enzyme (EF_{G75}, TMA II): 0,86; tRNS: 0,125;

Poly U: 0,05; PEP-Kinase: 0,01;
in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85;
Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6; Mg ac: 14;
NH₄Cl: 13,2; ¹⁴C-Phe (48,5 C/Mol): 0,01.

Diskussion des Poly U-abhängigen Systems

Die zellfreien Systeme von *Saccharomyces* und *Escherichia coli* unterscheiden sich voneinander durch die höhere Phenylalanin-Einbaurate des Bakteriensystems. Eine ausgesprochene Bedürftigkeit für tRNS konnte im *Saccharomyces*-System als auch in dem hier präparierten *Escherichia coli*-System nicht festgestellt werden. Wahrscheinlich waren die Ribosomen noch mit tRNS beladen und hätten zur weiteren Reinigung präinkubiert werden müssen.

Die hohe Magnesiumkonzentration (23,3 mMol/l) war für die Polypeptidsynthese erforderlich, da keine Initiator-tRNS zugesetzt wurde. Proteine, die bei niedriger Magnesiumkonzentration (8,5 mMol/l) synthetisiert wurden, müßten daher Methionin am Anfang tragen, das durch endogen vorhandene Initiator-tRNS angeliefert wurde.

In Systemen mit hoher und niedriger Magnesiumkonzentration zeigte die Stimulierung durch Poly U Schwankungen. Ein Trend zu ausgeprägterer Stimulierung ließ sich allerdings in Gegenwart höherer Magnesiumkonzentration feststellen. Überraschend ist die geringe Abhängigkeit von Poly U in Systemen, die mit aus Untereinheiten reassozierten Ribosomen präpariert wurden. Da zu erwarten ist, daß gerade diesen Ribosomen kein endogener Messenger mehr anhaftet, kann für dieses unerwartete Verhalten keine Erklärung gegeben werden.

Im Energiebedarf als auch in der Abhängigkeit von Ribosomen und Überstandsenzymen unterscheiden sich die beiden Systeme (8,5 und 23,3 mM Mg^{++}) nicht merklich voneinander. Der Phenylalanin-Einbau ohne diese essentiellen Substanzen zeigte Schwankungen, war jedoch im allgemeinen gering. Die Hemmung durch inaktive Aminosäuren liegt möglicherweise an einer Falschbeladung der tRNS oder an unreinen Aminosäurepräparaten.

Puromycin, das Analogon von Aminoacyl-tRNS, inhibierte die Proteinsynthese unterschiedlich. Eine Versuchsreihe mit 0,005 - 0,2 mg Puromycin im Reaktionsgemisch zeigte unabhängig von der Konzentration 55 - 75 %ige Hemmwirkung.

Überraschend war die Hemmung durch Chloramphenicol, einem bekannten Inhibitor für Bakterien- und Chloroplasten-Systeme, das die Aktivität des Poly-Phe-synthetisierenden Saccharomyces-Systems auf 90 bzw. 69 % senkte. Andere Autoren konnten eine ähnliche Wirkung am Hefe-System (125,143,188) als auch in zellfreien Systemen aus Tieren (215) nicht nachweisen.

Wie bekannt, bindet Chloramphenicol an die 50 S-Ribosomen-Untereinheit (204) und hemmt die Peptidyltransferase-Reaktion (65). Die Poly-Phenylalaninsynthese des hier präparierten E. coli-Systems konnte daher bis auf 4 % inhibiert werden. Die Hemmung des Hefesystems könnte erklärt werden, wenn die Anwesenheit von Mitochondrien-Ribosomen angenommen wird. Daß ein mitochondriales Protein synthetisierendes System aus Saccharomyces cerevisiae in vivo und in vitro durch spezifisch auf Bakterien wirkende Antibiotika (Chloramphenicol, Erythromycin, Spiramycin) gehemmt wird, konnte bereits nachgewiesen werden (30). Die Ähnlichkeit zwischen den Mitochondrien-Ribosomen aus Hefe und E. coli-Ribosomen läßt sich an Hand der Sedimentationskonstanten der rRNS belegen: bei Mitochondrien 22 S und 14 S; bei E. coli 23 S und 16 S. Die cytoplasmatische Hefe-rRNS sedimentierte mit 26 S und 17 S (64). Der Anteil der Mitochondrien-Ribosomen könnte ferner in Systemen höher sein, die aus unter starker Belüftung gezüchteten Hefen präpariert wurden. In anaerob kultivierten Hefezellen geht nämlich die typische Mitochondrienstruktur verloren (30,126).

4.1.2.2 Zeitlicher Ablauf der Proteinsynthese

Im von Poly U-abhängigen zellfreien System hatte nach 30 Min die Proteinsynthese ihr Maximum erreicht. Die Aktivität des Systems war in Gegenwart von 8,5 mM Mg^{++} /l stets niedriger als bei 23,3 mM Mg^{++} /l (Abb. 26).

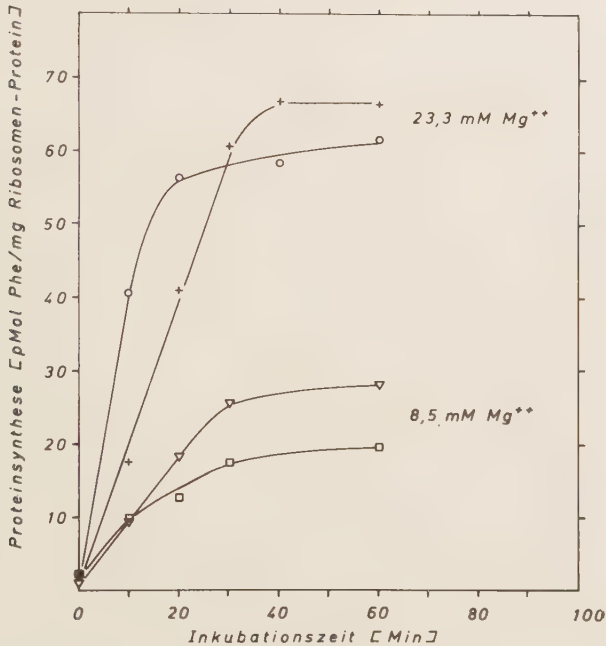


Abb. 26

Zeitlicher Verlauf des Phenylalanin-Einbaus in durch heiße TCA-fällbare Proteine.

Inkubation bei 30°C. Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

+ — + und o — o: Mg ac: 14 μ Mol;

Enzyme (EF_{G75}, TMA III): 1 mg;

Ribosomen-Proteine (RF_{TMA II}): 3,5 mg;

∇ — ∇ und □ — □: Mg ac: 5,1 μ Mol;

Enzyme (EF_{G75}, TMA III): 1,2 mg;

Ribosomen-Proteine (RF_{TMA III}): 3 mg;

in mg: tRNS: 0,5; Poly U: 0,05; PEP-Kinase: 0,01;

in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85;

Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6; NH_4Cl : 13,2;

^{14}C -Phe (48,5 C/Mol): 0,01.

4.1.2.3 Aminoacylierung der tRNS

Aus der Differenz des in kalt gefällten und gekochten Proteinen eingebauten Phenylalanins läßt sich unmittelbar auf den Anteil der Phe-tRNS schließen. Dieser betrug etwa ein Drittel der neu synthetisierten Proteine (Abb. 27a/b).

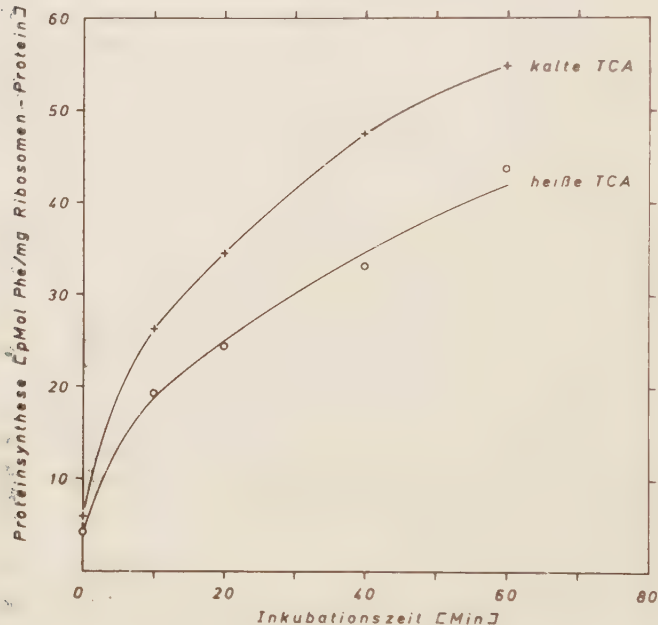


Abb. 27a

Aminoacylierung der tRNS. Zeitlicher Verlauf des Phenylalanin-Einbaus in durch kalte und heiße TCA fällbare Niederschläge.

Inkubation bei 30°C. Ansätze zu 0,6 ml enthielten:
in mg: Ribosomen-Protein (RF_{TMA IV}): 1,8;

Überstandsenzyme (EF_{G75, TMA II}): 1,9;

Poly U: 0,05; tRNS: 0,125; PEP-Kinase: 0,01;

in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85;

Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6; Mg ac: 14;

NH₄Cl: 13,2; ¹⁴C-Phe (48,5 C/Mol): 0,01.

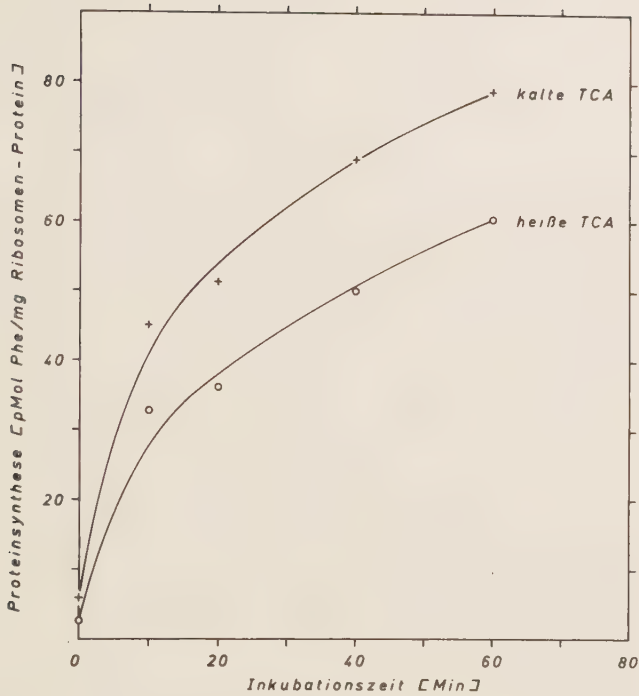


Abb. 27b

Aminoacylierung der tRNS. Zeitlicher Verlauf des Phenylalanin-Einbaus in durch kalte und heiße TCA fällbare Niederschläge.

Inkubationsbedingungen wie unter Abb. 27a.

Ribosomen-Protein ($RF_{TMA II}$): 2 mg;

Überstandsenzyme ($EF_{G75, TMA II}$): 1,3 mg.

4.1.3 Das DNS-abhängige System

Von besonderem Interesse ist die DNS-abhängige-RNS-gesteuerte Proteinsynthese in vitro, die geeignet ist, Vorgänge der Enzymsynthese und Regulation zu studieren. Zuerst waren es bakterielle Systeme, an denen entsprechende Untersuchungen durchgeführt wurden. ZILLIG et al. (51) berichteten schon 1962 über ein zellfreies System aus *Escherichia coli*, das in Gegenwart von Phagen-DNS radioaktives Leucin in Proteine einbaute. Weitere Arbeiten folgten 1966 (181,201) mit DNS verschiedenen Ursprungs. Alle getesteten Desoxyribonucleinsäuren aus Säugetiergeweben (Rattenleber, Kalbsthymus, Ehrlich-Ascites-Tumor) waren im *E. coli*-System inaktiv, während DNS von Phagen der T-Reihe besonders hohe Prägeraktivität besaß (60-90 fach höherer Einbau im Vergleich zum System ohne DNS). In jüngster Zeit gelang es SCHWEIGER et al. (75-77) aktive phagenspezifische Enzyme im *E. coli*-System zu synthetisieren. Die Koppelung von Translation und Transkription untersuchten BRYAN et al. (29) mit der replikativen DNS-Form des Bakteriophagen X-174 in einem in vitro-System aus *E. coli*, während sich ZUBAY et al. (36,227) um die Aufklärung der Regulation des Lac-Operons mit Hilfe in vitro synthetisierter aktiver β -Galactosidase bemühten.

In letzter Zeit sind zellfreie Systeme von höheren Organismen entwickelt worden, deren Proteinsynthese durch DNS stimuliert werden kann. DNS-Extrakte aus Leberkernen begünstigten den Aminosäureeinbau in besonderem Maße (NAORA et al. (141,142)). Auch in zellfreien Systemen der Grünalge *Chlorella* wurde eine Stimulierung der Proteinsynthese durch DNS aus Kalbsthymus, Lachssperma, *Anacystis* und *Chlorella* beobachtet (GALLING (68,70)).

Über die Darstellung eines DNS-abhängigen Protein synthetisierenden Hefesystems ist bisher noch nicht berichtet worden. Es erschien daher interessant, festzustellen, ob und welche DNS-Arten im zellfreien System von *Saccharomyces* Prägeraktivität besitzen. Für die Versuche standen DNS aus

Saccharomyces Stamm 211, Kalbsthymus und T4-Phage zur Verfügung.

Die Darstellung des Systems erforderte besonders präparierte Ribosomen, von denen sich die durch Dissoziation gewonnenen Fraktionen als geeignet erwiesen. Die Enzym-Fraktion wurde dem gesamten Überstand (Zentrifugation mit $105000 \times g$) entnommen.

Mit in KCl-Puffer dissoziierten und in Standard-TMA-Puffer reassozierten Ribosomen (Kap. 3.4.4.6.3, Dialyse, 3. Versuch) ließ sich ein System herstellen, dessen Proteinsynthese in unmittelbarem Zusammenhang mit der Konzentration der angebotenen Kalbsthymus-DNS stand (Abb. 28).

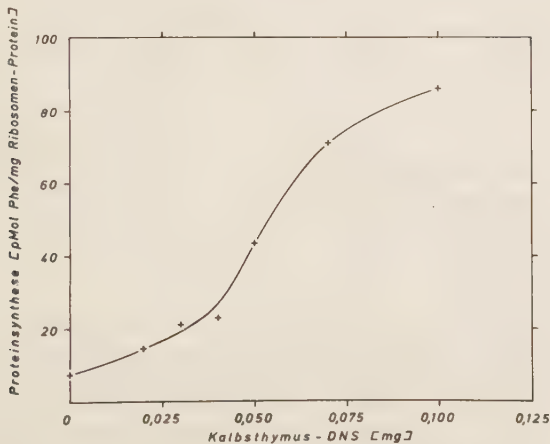


Abb. 28

Phenylalanin-Einbau in Abhängigkeit von der Kalbsthymus-DNS-Konzentration.

Inkubation 60 Min bei 30°C . Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine (RF_{KCl} s. Kap. 3.4.4.6.3, Dialyse, 3. Versuch) = 0,98;
Enzyme (EF_{G75}, TMA III) = 2,75;

tRNS: 0,125; PEP-Kinase: 0,0125;
in μMol : ATP: 1,48; GTP: 1,46; UTP: 0,022;
CTP: 0,023; PEP: 6,05; Mg ac: 5,1;
Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6; NH_4Cl : 13,2;
19 inaktive Aminosäuren: je 0,025;
 ^{14}C -Phe (48,5 C/Mol): 0,01;
Kalbsthymus-DNS: 0 - 0,1 mg.

Das durch Kalbsthymus-DNS stimulierte System ist von essen-
tiellen Bestandteilen weniger abhängig als die Poly U-stimu-
lierten Systeme (Tab. 16 und 14a/b). Zum Vergleich ist ein
E. coli-System aufgeführt, das mit T4-Phagen-DNS arbeitet.

Objekt	Saccharomyces Stamm 211	Escherichia coli
Komplettes System .pMol Phe/mg Ribo- somen-Protein	86,1 = 100 %	152 = 100 %
minus DNS	9 %	26 %
minus energieliefern- de Substanzen	52 %	
minus UTP u. CTP	40 %	
minus inaktive Aminosäuren	59 %	
minus Ribosomen		30 %
minus Enzyme		1 %
minus tRNS		25 %
plus Chloramphenicol		4 %
plus Actinomycin		2 %
plus Überstand von KCl-behandelten Ribosomen Kap. 3.4.4.6.3	76 %	

Tab. 16: DNS-stimulierte zellfreie Systeme von
Saccharomyces mit Kalbsthymus-DNS und
Escherichia coli mit T4-Phagen-DNS.

Saccharomyces: Isolierung der zellfreien Fraktionen
und Inkubationsbedingungen wie unter Abb. 28
angegeben. Kalbsthymus-DNS: 0,1 mg/Ansatz.

Escherichia coli: Isolierung der zellfreien Fraktionen
nach ZILLIG et al. (200).

Inkubation 60 Min bei 37°C.

Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine: 1,18;
Enzyme: 2,56; PEP-Kinase: 0,01;
tRNS_{E. coli}: 0,125; T4-Phagen-DNS: 0,027;

in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; CTP: 1,23;
UTP: 1,23; PEP: 4,85; Mg ac: 14;
Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6;
19 inaktive Aminosäuren: je 0,025;
NH₄Cl: 13,2; ¹⁴C-Phe (5 C/Mol): 0,1.

DNS aus verschiedenen Organismen diente als Prägersubstanz in einem Protein synthetisierenden *Saccharomyces*-System, das sowohl mit in Standardpuffer gewaschenen Ribosomen als auch mit reassozierten Ribosomen-Untereinheiten präpariert worden war (Tab. 17a-c).

Die Homogenität des Kalbsthymus-DNS-Präparats war zuvor mit Hilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation untersucht worden (Abb. 29).

Zur Herstellung eines zellfreien Systems aus *Escherichia coli* nach ZILLIG et al. (200) wurden die Ribosomen mit energieliefernden Substanzen präinkubiert. Dieses System ließ sich durch T4-Phagen-DNS stimulieren (Tab. 17a).

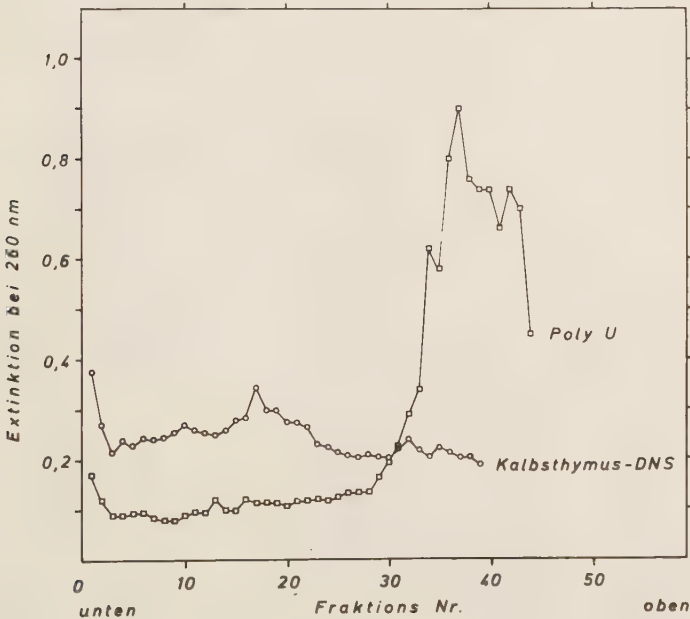


Abb. 29

Dichtegradienten-Zentrifugation von Kalbsthymus-DNS und Poly U.

16 h, 55000 x g. Sucrose-Konzentration: 5 - 25 %.

Versuch Nr.	Zellfreies System	ohne DNS	T4-Phage	Proteinsynthese mit DNS aus Kalbsthymus	Saccharomyces Stamm 211
1	Saccharomyces	6,1	12,2		
2	"	13,1	41,6		
3	"	17,8	53,2		
4	Escherichia coli	40,7	152	51	48,6

Tab. 17a: Proteinsynthese (pMol Phe/mg Ribosomen-Protein) zellfreier Systeme aus Saccharomyces und Escherichia coli mit DNS verschiedenen Ursprungs. Züchtungsbedingungen der Zellen: starke Belüftung.

Escherichia coli: Isolierung der zellfreien Fraktionen nach ZILLIG et al. (200)

Inkubationsbedingungen wie unter Tab. 16 angegeben.

Saccharomyces : Inkubation 60 Min bei 30°C. Ansätze zu 0,5 ml enthalten:

in mg :
 Versuch Nr. Ribosomen-Proteine Enzyme
 1 RF TMA II : 2,3 EF DEAE: 0,08
 2 RF ATP+Mg : 1,31 EF DEAE: 0,26
 3 RF NH₄Cl : 0,89 EF DEAE: 0,26
 Kap. 3.4.4.5

in μ Mol :
 tRNS: 0,5; PEP-Kinase: 0,01; T4-Phagen-DNS: 0,027;
 ATP: 1,18; GTP: 1,15; UTP: 1,23; CTP: 1,23;
 PEP: 5,1; Mg ac: 13; Tris ac pH 7,5: 15; Merc: 0,5;
 NH₄Cl: 11; 19 inaktive Aminosäuren: je 0,08;
¹⁴C-Phe (5 G/Mol): 0,1.

Versuch Nr.	ohne DNS	Proteinsynthese mit DNS aus Saccharomyces Kalbsthymus Stamm 211	T4-Phage	zellfreie Fraktionen	Mg ⁺⁺ -Konz. im Ansatz (mmol/l)
5	8,25	8,9	7,1	RF _{TMA} II, EF _{G75} , TMA II	23,3
6	9	7,8	9,4	RF _{TMA} IV, EF _{G75} , TMA II	23,3
7	1,6	2,25	1,9	RF _{TMA} IV, EF _{G75} , TMA II	23,3
8	7,5	20,1		RF _{TMA} II, EF _{G75} , TMA II	23,3
9	5,12	5,85	4,75	RF _{TMA} III, EF _{G75} , TMA III	8,5

Tab. 17b: Proteinsynthese (pMol Phe/mg Ribosomen-Protein) zellfreier Systeme aus Saccharomyces Stamm 211 in Gegenwart von DNS verschiedenen Ursprungs. Züchtungsbedingungen der Hefen: leichtes Schütteln. Ribosomen in Standardpuffern gewaschen. Inkubation 60 Min bei 30°C. Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

Versuch 5 - 8:

in mg: Ribosomen-Proteine: 1,6 - 1,9;
Enzyme: 0,8 - 1,2; tRNS: 0,125
PEP-Kinase: 0,01; Hefe-DNS: 0,05
Kalbsthymus-DNS: 0,025;
T4-Phagen-DNS: 0,027;
in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,17; UTP: 0,022;
GTP: 0,023; PEP: 4,85; Mg ac: 14;
Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6;
19 inaktive Aminosäuren: je 0,025;
NH₄Cl: 13,2; ¹⁴C-Phe (5 G/Mol): 0,1.

Versuch 9:

in mg: Ribosomen-Proteine: 1,7;
Enzyme: 1,2; tRNS: 0,125;
PEP-Kinase: 0,0125;
Kalbsthymus-DNS: 0,05;
T4-Phagen-DNS: 0,027;
in μ Mol: ATP: 1,48; GTP: 1,46; UTP: 0,022;
GTP: 0,023; PEP: 6,05; Mg ac: 5,1;
Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6;
19 inaktive Aminosäuren: je 0,025;
NH₄Cl: 13,2; ¹⁴C-Phe (48,5 G/Mol): 0,01.

Versuch Nr.	Proteinsynthese mit DNS aus		Mg ⁺⁺ -Konz. im Ansatz (mMol/l)
	ohne DNS	Saccharomyces Stamm 211 Kalbsthymus T4-Phage	
10	0,94	6,8	23,3
11	0,94	2,65	23,3
12	2,91	8,5	23,3
13	1,63	11,5	8,5
14	1,44	12,1	8,5
15	7,6	86,1	8,5

Tab. 17c: Proteinsynthese (pMol Phe/mg Ribosomen-Protein) zellfreier Systeme aus Saccharomyces Stamm 211 in Gegenwart von DNS verschiedenen Ursprungs. Züchtungsbedingungen der Hefen: leichtes Schütteln. Ribosomen in Untereinheiten dissoziiert und reassoziert. Inkubation 60 Min bei 30°C. Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

Versuch Nr.	Ribosomen-Präparate	Kap.	Enzyme	
			mg	mg
10	niedr. Mg ⁺⁺ , reass.	3.4.4.6.2/3. Vers.	1,9	EF G75, TMA II 0,86
11	niedr. Mg ⁺⁺ , reass.	3.4.4.6.2/2. Vers.	2,4	EF G75, TMA II 0,9
12	KCl, Dialyse, reass.	3.4.4.6.3/2. Vers.	2,2	EF G75, TMA II 1,1
13	niedr. Mg ⁺⁺ , reass.	3.4.4.6.2/3. Vers.	1,7	EF G75, TMA II 1,5
14	KCl, Dialyse, reass.	3.4.4.6.3/1. Vers.	1,8	EF G75, TMA II 1,45
15	KCl, Dialyse, reass.	3.4.4.6.3/3. Vers.	1,0	EF G75, TMA III 2,75

Versuch 10 - 12:

Hefe-DNS: 9,2 µg; Kalbsthymus-DNS: 50 µg

¹⁴C-Phe (48,5 C/Mol): 0,01;

weitere Bestandteile wie Versuche 5 - 8

Versuche 13 - 15:

Kalbsthymus-DNS: 0,1 mg

weitere Bestandteile wie Versuch 9

Einen Vergleich zwischen der Stimulierung der Proteinsynthese durch DNS und Poly U gibt Tab. 18.

Vers. Nr.	Objekt	Präparation der Ribosomen	Mg ⁺⁺ -Konz. im Ansatz (mM)	DNS-System pMol Phe/mg Ribos.-Prot.	Poly U-System pMol Phe/mg Ribos.-Prot.
4	E. coli	ATP-präink.	23,3	T4-Phage 152	71
6	Hefe	Standard-TMA-Puffer gewaschen	23,3	Kalbsthymus 9,4	27,7
7	Hefe	"	23,3	Kalbsthymus 2,2	26,6
8	Hefe	"	23,3	Saccharomyces 20,1	27,4
9	Hefe	"	8,5	Kalbsthymus 5,85	12,25
13	Hefe	dissoziiert reassoziert	8,5	Kalbsthymus 11,5	2,19
14	Hefe	"	8,5	Kalbsthymus 12,1	2,14
15	Hefe	"	8,5	Kalbsthymus 86,1	14,5

Tab. 18: Proteinsynthese in DNS- und Poly U-abhängigen Systemen von Saccharomyces und Escherichia coli.

Diskussion des DNS-abhängigen Systems

Die Stimulierung der Proteinsynthese mit Hefe- und Kalbsthymus-DNS gelang, wenn die Ribosomen zuvor in Untereinheiten gespalten und dann reassoziert waren. Dialyse gegen Puffer mit niedriger Mg^{++} -Konzentration als auch Spaltung während einer Dialyse gegen KCl-Puffer erwiesen sich in gleicher Weise als wirksam.

Mit einer Ausnahme (Versuch 8: DNS aus *Saccharomyces*) konnte dagegen kein von DNS abhängiges System erhalten werden, wenn die Ribosomen mit Standard-TMA-Puffer gewaschen wurden.

Das *Escherichia coli*-System sprach auf T4-Phagen-DNS an, war aber gegen DNS aus Kalbsthymus und *Saccharomyces* inaktiv.

Bemerkenswert erscheint die unterschiedliche Stimulierung der Proteinsynthese im Hefesystem durch T4-Phagen-DNS. Lediglich in Systemen aus Hefen, die unter stark aeroben Bedingungen gezüchtet wurden, war ein dreimal höherer Phenylalanin-Einbau zu verzeichnen als im Kontrollversuch. Möglicherweise könnten auch hier, wie bei der Inhibierung durch Chloramphenicol im Poly U-System, Mitochondrien-Ribosomen eine Rolle spielen.

Obwohl mit Kalbsthymus-DNS eine 11-fache Stimulierung - bei beginnender DNS-Sättigung - erreicht werden konnte (Abb. 28), war das System von anderen essentiellen Bestandteilen nur wenig abhängig (Tab. 16). Die Zugabe eines Überstandes, der durch Zentrifugation von gegen KCl dialysierten Ribosomen gewonnen wurde (Kap. 3.4.4.6.3), inhibierte das zellfreie System. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Befunden anderer Autoren (74,85), die von einem stimulierenden Einfluß des "KCl-Überstandes" auf die in vitro-Synthese von Hämoglobin berichteten.

Die ausgeprägte DNS-Stimulierung stand in einem Gegensatz zum geringen von Poly U gesteuerten Phenylalanin-Einbau in Systemen mit reassozierten Ribosomen-Untereinheiten. Eine Erklärung konnte dafür nicht gefunden werden.

4.2 Die Hemmung des zellfreien Systems durch Röntgenbestrahlung

Die biologischen Wirkungen von UV- und ionisierenden Strahlen sind seit mehr als einem Jahrhundert bekannt. Die Aufdeckung ihrer molekularen Ursachen konnte jedoch erst nach Trennung des biologischen Materials in einzelne definierte Substanzen gelingen. Dabei zeigte sich, daß Schäden bevorzugt an der DNS auftreten. Die verschiedenen strahleninduzierten Reaktionsprodukte der DNS-Bausteine sind chemisch erfaßbar und weitgehend bekannt (61).

Aber auch die Behandlung von Ribosomen und Enzymen mit ionisierenden Strahlen führt zu verminderter Proteinsynthese. Für die weitere Erforschung strahlenempfindlicher Orte dieser Zellkomponenten bietet sich das zellfreie Protein synthetisierende System an. Überdies lassen sich durch Bestrahlungsexperimente infolge einer unterschiedlichen Strahlenempfindlichkeit der einzelnen Nucleinsäurebasen Einblicke in den Mechanismus der Proteinbiosynthese gewinnen. So erhielt man wertvolle Hinweise zur Klärung der Codon-Anticodon-Paarung zwischen mRNA und tRNA aus Bestrahlungsversuchen an künstlichen Polynucleotiden sowie an a-tRNA (206).

Als Objekt für derartige Untersuchungen diente bisher überwiegend *Escherichia coli*. Ein Vergleich mit einem Eucaryot wie Hefe scheint daher interessant zu sein.

4.2.1 Methode

Zur Bestrahlung des Materials diente eine Wolfram-Röhre (Machlett OEG-60), deren Leistung in der verwandten Versuchsanordnung bei 55 kV und 25 mA mit 30 Krad/Min gemessen wurde. Wegen der starken Erwärmung im Verlauf der Bestrahlung war eine kontinuierliche Eiskühlung der zu bestrahlenden Lösung in doppelwandigen Schälchen ($\varnothing$ 3 cm, Höhe 1,5 cm) erforderlich. Ständiges Rühren gewährleistete

eine ausreichende Durchmischung. Während einer Versuchsreihe wurde nach Applizierung der gewünschten Dosis die für einen Versuchsansatz benötigte Menge aus der bestrahlten Stammlösung (Ribosomen ca. 1 ml, Enzyme ca. 3 ml) entnommen. Die Polyphenylalaninsynthese erfolgte unter Standardbedingungen.

4.2.2 Bestrahlung der Ribosomen

Da 2-Mercaptoäthanol als Sulfhydrylgruppe tragende Verbindung ähnlich den seit langem bekannten Strahlenschutzstoffen Cystein, Cystin, Cysteamin, Cystamin, Thioglykol und Glutathion Proteine vor indirekter Strahlenwirkung schützt, wurden die Ribosomen in 2-Mercaptoäthanol freiem Puffer suspendiert (RF_{TMA IV}). Zum Vergleich wurde auch eine Ribosomen-Suspension in 2-Mercaptoäthanol haltigem Puffer in gleicher Weise bestrahlt und im zellfreien System eingesetzt. Dabei zeigte sich bei beiden Ribosomenpräparaten ein ähnlicher Grad der Inaktivierung. Demnach bedarf es für einen wirksamen Strahlenschutz der Ribosomen wesentlich höherer Konzentrationen als 1 μ Mol 2-Mercaptoäthanol auf 35 mg Ribosomen-Protein.

	Versuch Nr.	pMol Phe/mg Ribosomen-Protein		Proteinsynthese (%) bez. auf unbestrahltes kompl. System minus RF	
		RF 0 Krad	RF 1800 Krad	RF 1800 Krad	
zu Abb. 30	1	4,3	1,4	33	5,5
	2	7,2	1,9	26	12
	3	18,1	4,0	22	26
	4	80,4	14,1	17,5	3
	5	87	12,1	14	1
zu Abb. 31	1	31,4	3,1	9,6	3

Tab. 19: Phenylalanin-Einbau zellfreier Systeme aus Saccharomyces Stamm 211 in Gegenwart von unbestrahlten und bestrahlten Ribosomen. Die Zusammensetzung der Reaktionsgemische ist unter den jeweiligen Abb. aufgeführt.

Zwischen dem Grad der Inaktivierung durch Bestrahlung und der Fähigkeit des unbestrahlten Systems zur Proteinsynthese besteht eine deutliche Korrelation. Je inaktiver das System vor der Bestrahlung war, desto weniger wirkte sich die applizierte Dosis von 1800 Krad auf die Proteinsynthese aus (Tab. 19).

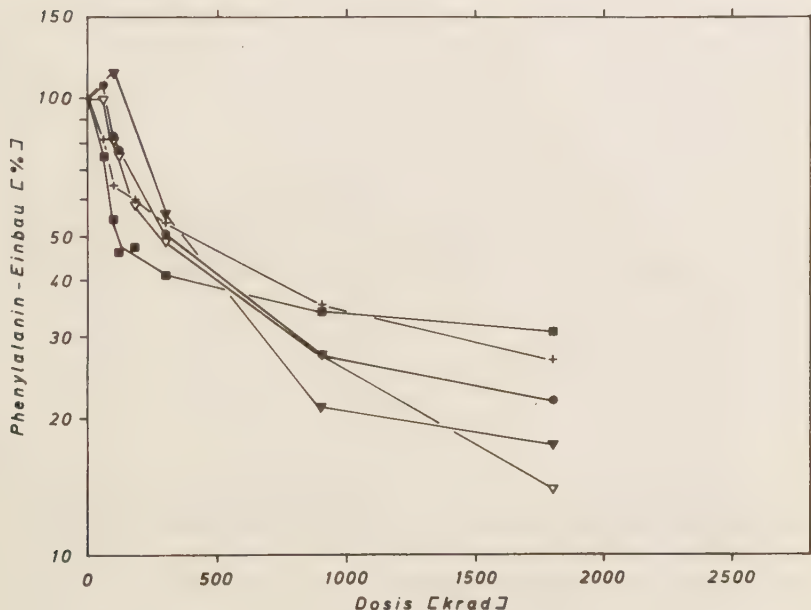


Abb. 30

Inaktivierung des zellfreien Systems von *Saccharomyces* Stamm 211 durch Röntgenbestrahlung der Ribosomen.

Inkubation 60 Min bei 30°C.

Ribosomen in 2-Mercaptoäthanol-freiem Puffer.

Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine (RF_{TMA IV}): 1,6 - 2,0;

Enzyme (EF_{G75, TMA II}): 1 - 1,5;

Poly U: 0,05; tRNS: 0,125; PEP-Kinase: 0,01;

in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85; Mg ac: 14;

Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,55; NH₄Cl: 13,2;

¹⁴C-Phe (48,5 C/Mol): 0,01.

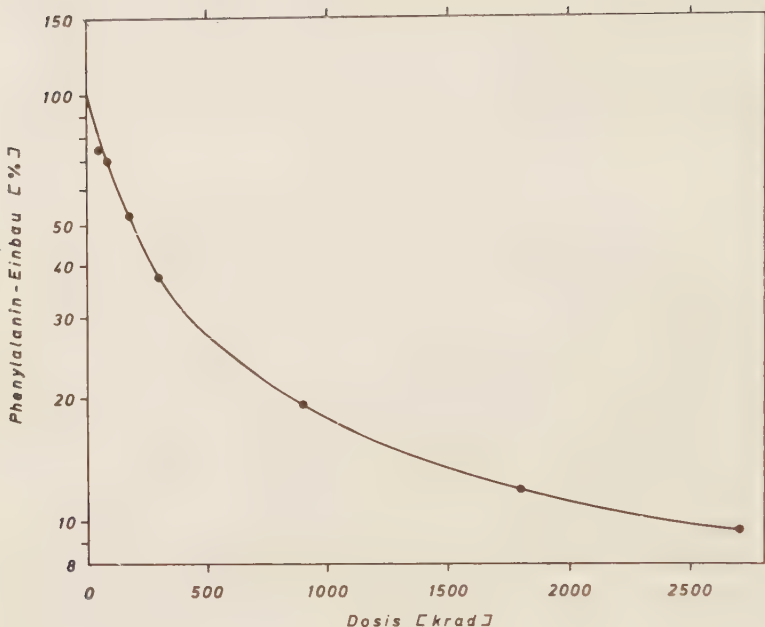


Abb. 31

Inaktivierung des zellfreien Systems von *Saccharomyces* Stamm 211 durch Röntgenbestrahlung der Ribosomen.
Inkubation 60 Min bei 30°C.

Ribosomen in 2-Mercaptoäthanol-haltigem Puffer.

Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine (RF_{TMA II}): 1,54;

Enzyme (EF_{G75, TMA II}): 1,7; Poly U: 0,05;

tRNS: 0,125; PEP-Kinase: 0,0125;

in μ Mol: ATP: 1,48; GTP: 1,44; PEP: 6,05; Mg ac: 5,1;

Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6; NH₄Cl: 13,2;

¹⁴C-Phe (48,5 C/Mol): 0,01.

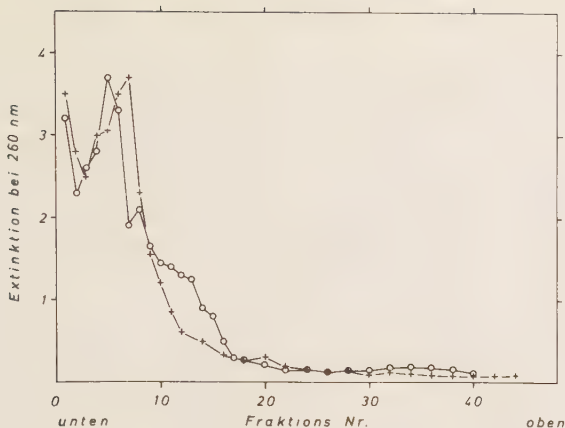


Abb. 32

Dichtegradienten-Zentrifugation bestrahlter und unbestrahlter Ribosomen-Fractionen aus *Saccharomyces*.
 Sucrose: 5 - 50 %. 3 h, 55000 x g.

Ribosomen in Standardpuffer TMA V (ohne 2-Mercaptoäthanol) gewaschen und suspendiert.

+ — +: unbestrahlt

o — o: bestrahlt: 2700 Krad

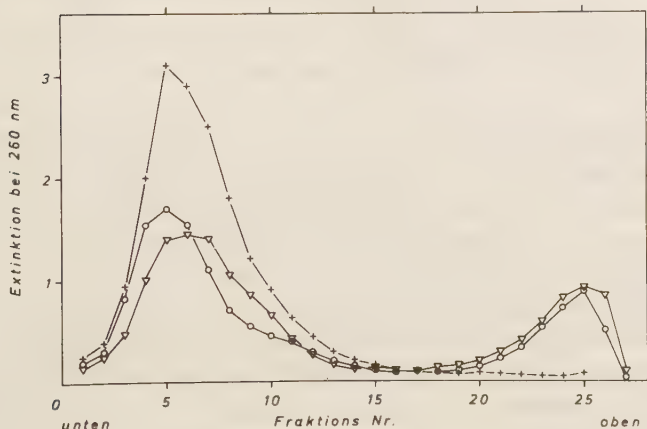


Abb. 33

Dichtegradienten-Zentrifugation bestrahlter und unbestrahlter Ribosomen-Fractionen aus *Saccharomyces*.
 Sucrose: 5 - 50 %. 3 h, 55000 x g.

Ribosomen mit NH_4Cl -haltigem Puffer gewaschen (Kap. 3.4.4.3 Waschpuffer C) und in Standardpuffer TMA II (mit 2-Mercaptoäthanol) suspendiert.

+ — +: unbestrahlt

o — o: bestrahlt: 300 Krad

▽ — ▽: bestrahlt: 900 Krad

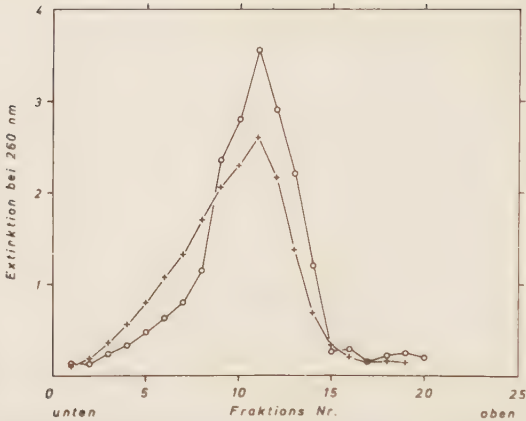


Abb. 34

Dichtegradienten-Zentrifugation bestrahlter und un-
bestrahlter Ribosomen-Fractionen aus *Escherichia coli*.
Sucrose: 5 - 50 %. 3 h, 55000 x g.

Präparation der zellfreien Fractionen nach
ZILLIG et al. (200).

Ribosomen in Standardpuffer TMA II suspendiert.

+ — +: unbestrahlt

o — o: bestrahlt: 300 Krad

Durch Röntgenbestrahlung (2700 Krad) bedingte Strukturver-
änderungen der Ribosomen ließen sich durch Dichtegradienten-
Zentrifugation nicht nachweisen, wenn die Ribosomen zuvor
in Standardpuffer präpariert wurden (Abb. 32). Demgegen-
über spalteten mit NH_4Cl -Puffer gewaschene Ribosomen nach
Bestrahlung (300 bzw. 900 Krad) leichte Partikel ab (Abb. 33).
Vermutlich verloren die Ribosomen bei der Behandlung mit
 NH_4Cl strukturstabilisierende Faktoren, wodurch sie strah-
lensensibel wurden.

Ähnliche Versuche an *E. coli*-Ribosomen ließen nach Bestrah-
lung mit 300 Krad bei der Dichtegradienten-Zentrifugation
keine Veränderungen erkennen (Abb. 34). Demgegenüber gibt
es Befunde (195) von einer durch Bestrahlung induzierten

Dissoziation in 30 S- und 50 S-Untereinheiten, deren Grad exponentiell mit der Dosis zunimmt. Die reassozierten Ribosomen-Untereinheiten sollen sich in der Polyphenylalanin-Synthese nicht von unbestrahlten Ribosomen unterscheiden. Anderen Berichten (57) zufolge läßt sich die Inaktivierung steigern, wenn die Ribosomen vor oder nach der Bestrahlung in 30 S- und 50 S-Partikel dissoziiert werden.

Untersuchungen über die Hemmung der Polyphenylalanin-Synthese durch mit Röntgenstrahlen behandelte E. coli-Ribosomen liegen seit 1965 (206) vor, und eine 1966 veröffentlichte Dosiseffektkurve (110,111) gestattete die Berechnung des treffertheoretischen Molekulargewichtes. Diese Autoren betrachten als Ursache für die Erniedrigung des Aminosäure-Einbaus eine Aktivierung von Endonucleasen, die an die 30 S-Ribosomen-Untereinheit gebunden sind.

4.2.3 Bestrahlung der Enzymfraktion

In einem so komplexen Gemisch verschiedener Substanzen lassen sich nur schwer Aussagen über den Angriffsort von Röntgenstrahlen auf einzelne Enzyme machen.

Zunächst wurde die Beeinträchtigung der Aminoacylierung der tRNS durch Bestrahlung kontrolliert. Dabei zeigte sich, daß die Beladung der tRNS mit Phenylalanin prozentual etwa in gleichem Maße inaktiviert wurde wie die Polyphenylalanin-Synthese. Das Verhältnis von synthetisiertem Polyphenylalanin zu Phe-tRNS blieb daher auch nach Bestrahlung fast unverändert (Tab. 20 u. Abb. 35a/b). Dies gilt für zellfreie Systeme sowohl in Gegenwart von 8,5 als auch von 23,3 mMol Mg^{++}/l . Das gleiche geht aus Berichten über die Behandlung eines Enzympräparats (pH 5-Fraktion aus Hefe) mit ^{60}Co -Strahlen hervor. Danach sinkt die Phenylalaninbindung an tRNS mit steigender Dosis (222).

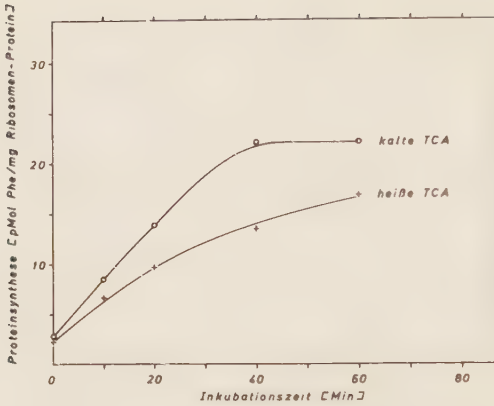


Abb. 35a

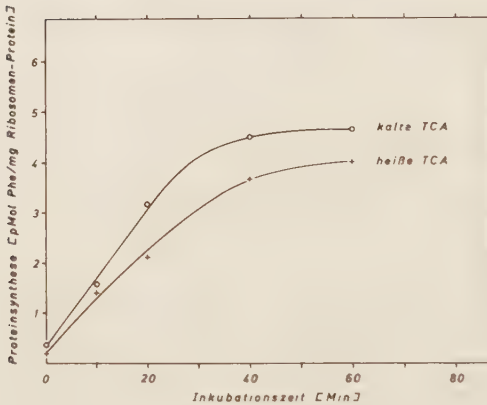


Abb. 35b

Abb. 35a/b: Zeitlicher Verlauf des Phenylalanin-Einbaus in Niederschläge, die in heißer und kalter TCA erhalten wurden. Zellfreies System aus *Saccharomyces* Stamm 211. Enzyme bestrahlt mit einer Dosis von 1800 Krad. Inkubationsbedingungen sind unter Tab. 20 aufgeführt.

- a: 23,3 $\text{mMol Mg}^{++}/\text{l}$.
Enzyme in Standardpuffer ohne 2-Mercapto-
äthanol = EF_{G75}, TMA IV.
- b: 8,5 $\text{mMol Mg}^{++}/\text{l}$.
Enzyme in Standardpuffer ohne 2-Mercapto-
äthanol = EF_{G75}, TMA V.

Enzym- fraktion	Abb.	Mg ⁺⁺ -Konz. im Ansatz (mMol/l)	pMol Phe/mg Ribosomen- Protein Niederschläge gefällt durch	kalte TCA	heiße TCA	pMol Phe/mg Ribosomen-Protein	Phe-tRNS angegeben in % bez. auf kalte TCA-gef. Nd.	Restaktivität (%) Protein- synthese
unbe- strahlt	35a	23,3	124	95,2		28,8	23,2	
	35b	8,5	13,1	11,1		2,1	16,0	
bestrahlt 1800 Krad	35a	23,3	22,4	16,8		5,6	25	19,5
	35b	8,5	4,65	4,05		0,6	12,9	28,5

Tab. 20: Phenylalanin-Einbau in mit heißer und kalter TCA fällbare Verbindungen eines zellfreien Systems aus *Saccharomyces* Stamm 211.
Enzyme unbestrahlt und röntgen-bestrahlt.
Inkubation 60 Min bei 30°C. Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

Abb. 35a: Ribosomen-Proteine (RF^{TMA II}): 1,33; in mg: Ribosomen-Proteine (RF^{TMA III}): 1,66;
Enzyme (EF^{G75, TMA IV}): 1,6;
Poly U: 0,05; tRNS: 0,125;
PEP-Kinase: 0,01;
in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85;
Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6;
Mg ac: 14; NH₄Cl: 13,2;
¹⁴C-Phe (48,5 C/Mol): 0,01.

Abb. 35b: Ribosomen-Proteine (RF^{TMA III}): 1,66;
Enzyme (EF^{G75, TMA V}): 1,2;
Poly U: 0,05; tRNS: 0,125;
PEP-Kinase: 0,0125;
in μ Mol: ATP: 1,48; GTP: 1,44; PEP: 6,05;
Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,6;
Mg ac: 5,1; NH₄Cl: 13,2;
¹⁴C-Phe (48,5 C/Mol): 0,01.

Die Dosiseffektkurven der durch bestrahlte Enzym-Fractionen inhibierten Proteinsynthese (Abb. 36b u. 37) zeigen den gleichen Verlauf wie bei Versuchen mit bestrahlten Ribosomen. Zwischen dem Grad der Inaktivierung bestehen für die verschiedenen Systeme (8,5 und 23,3 mMol Mg^{++}/l im Reaktionsgemisch) keine wesentlichen Unterschiede.

Ein Zusammenhang zwischen der Aktivität des unbestrahlten Systems mit dem Grad der Inaktivierung durch Röntgenbestrahlung ist ähnlich wie bei den Ribosomen auch für die Enzyme zu erkennen (Abb. 36a).

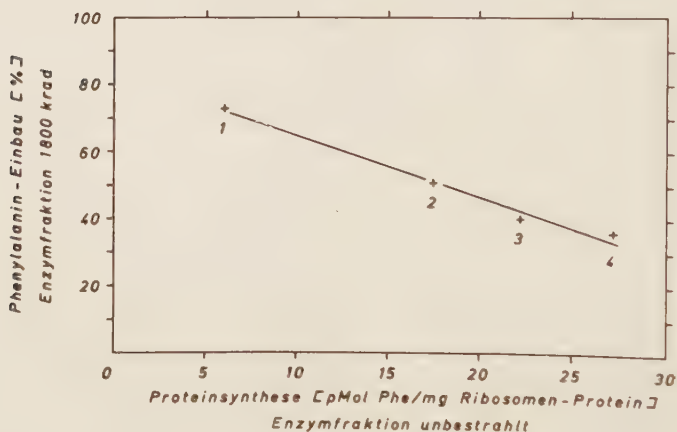


Abb. 36a

Phenylalanin-Einbau (%) verschiedener zellfreier Systeme aus *Saccharomyces* Stamm 211 mit bestrahlten Enzymfraktionen (1800 Krad) in Abhängigkeit vom Phenylalanin-Einbau des Systems mit unbestrahlter Enzymfraktion.

Die Zahlen an den Punkten stehen für die gleichen zellfreien Systeme, mit denen die in Abb. 36b dargestellten Dosiseffektkurven gewonnen wurden.

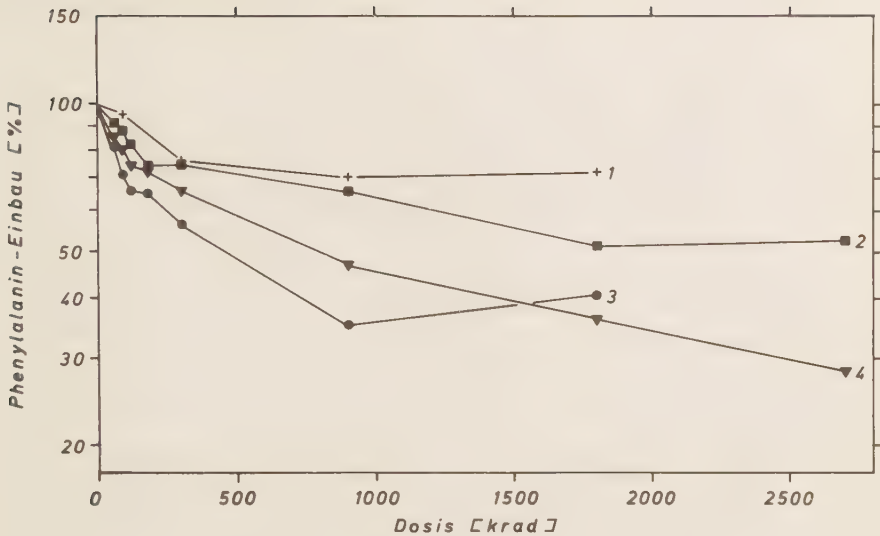


Abb. 36b

Inaktivierung der Überstandsenzyme durch Röntgenbestrahlung mit verschiedenen Dosen, gemessen am Phenylalanin-Einbau in mit heißer TCA fällbare Proteine des *Saccharomyces*-Systems.

Mg⁺⁺-Konzentration im Reaktionsgemisch: 23,3 mMol/l.
 Inkubation 60 Min bei 30°C.

Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine:

+ — +: RF_{TMA IV}: 1,33

■ — ■: RF_{TMA II}: 1,77

● — ●: RF_{TMA IV}: 1,08

▼ — ▼: RF_{TMA II}: 1,6

Enzyme:

EF_{G75, TMA II}: 1,6

EF_{G75, TMA IV}: 1,43

EF_{G75, TMA II}: 1,5

EF_{G75, TMA IV}: 1,23

Poly U: 0,05; tRNS: 0,125; PEP-Kinase: 0,01;

in μMol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85;

Tris ac pH 7,5: 18; Mg ac: 14; NH₄Cl: 13,2;

Merc: 0,55 (+ — + u. ● — ●)
 0,3 (■ — ■ u. ▼ — ▼)

¹⁴C-Phe (48,5 C/Mol): 0,01.

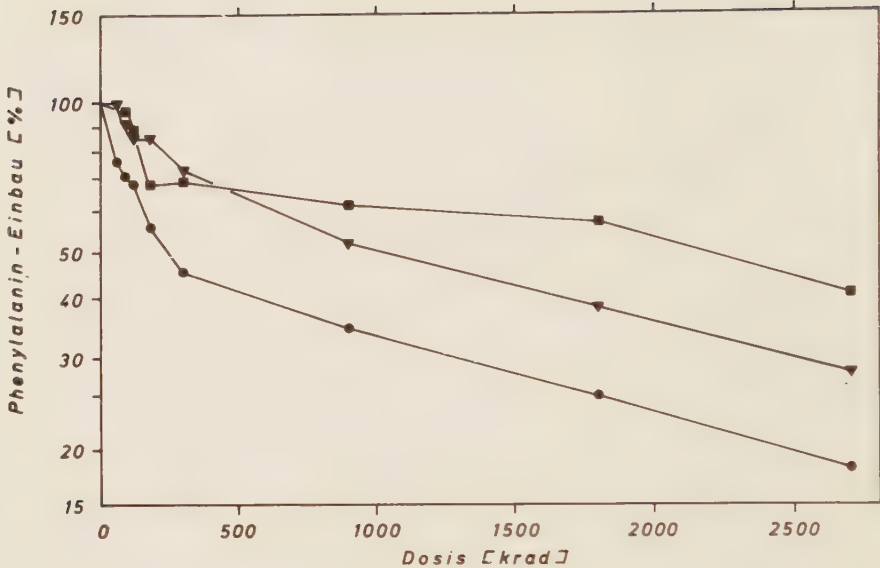


Abb. 37

Inaktivierung der Überstandsenzyme durch Röntgenbestrahlung mit verschiedenen Dosen, gemessen am Phenylalanin-Einbau in mit heißer TCA fällbare Proteine des *Saccharomyces*-Systems.

Mg⁺⁺-Konzentration im Reaktionsgemisch:

■—■: 8,0 mMol/l

▼—▼: 8,5 mMol/l

●—●: 8,5 mMol/l

Inkubation 60 Min bei 30°C. Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine (RF_{TMA II}): 1,75;

Enzyme:

■—■: EF dialysiert (Kap. 3.4.3.3/2. Vers.): 1,35;

▼—▼: EF_{G75, TMA IV} (ohne 2-Mercaptoäthanol): 2,72;

●—●: EF_{G75, TMA II} (mit 2-Mercaptoäthanol): 2,52;

Poly U: 0,05; tRNS: 0,125; PEP-Kinase: 0,125;

in μMol: ATP: 1,48; GTP: 1,44; PEP: 6,05;

Tris ac pH 7,5: 18; Mg ac: 5,1; (■—■: 4,8);

Merc: 0,6 (▼—▼: 0,3); NH₄Cl: 13,2;

¹⁴C-Phe (48,5 G/Mol): 0,01.

4.2.4 Bestrahlung von Poly U

Während die Bestrahlung von Poly U mit ultraviolettem Licht (UV) zu 2 Arten von Photoprodukten führt, und zwar den Uridin-Dimeren und den Uridinhydraten, die bei der Translation noch gelesen werden können (Dimere als Uracil-Uracil oder Guanin-Uracil, Uracilhydrat als Cytosin (158)), werden durch Röntgenbestrahlung die Basen zerstört und wahrscheinlich Brüche in der Ribosephosphatkette erzeugt. Dabei erwies sich Poly A gegenüber Poly U und Poly C als resistenter (206). So vermochte in einem zellfreien System UV-bestrahltes Poly U nur zu 5 % Messengerfunktion zu erfüllen (56), und röntgen-bestrahltes Poly U war nach Applizierung einer Dosis von 160 Krad nur noch zu 13 % aktiv (206).

Dagegen konnte in dieser Arbeit eine vergleichbare Inaktivierung durch Röntgenbestrahlung von Poly U im Saccharomyces-System nicht festgestellt werden (Abb. 38). Selbst nach einer applizierten Dosis von 2700 Krad wurden noch 60 % Phenylalanin-Einbau registriert, obwohl während der Bestrahlung kein 2-Mercaptoäthanol zugegeben war. Die ursprüngliche Aktivität des zellfreien Systems war ohne Einfluß auf den Inaktivierungsgrad durch bestrahltes Poly U.

Als Ursache für die geringe Inaktivierung könnte möglicherweise die hohe Mg^{++} -Konzentration von 23,3 mMol/l im Reaktionsgemisch in Frage kommen. Es ist bekannt (199), daß ein Messenger mindestens 150 Nucleotide lang sein muß, damit Proteine synthetisiert werden können. Bei Erhöhung der Ionenstärke werden jedoch auch kürzere Polynucleotide aktiv, so daß an strahleninduzierten Poly U-Bruchstücken noch Phenylalanin-Moleküle verknüpft werden könnten.

Nach einer kürzlich erschienenen Arbeit (32) über die Eignung verschiedener Poly U-Präparate zur Polyphenylalaninsynthese konnte noch Messengeraktivität nachgewiesen werden für ein Produkt, dessen Molekülgröße mit 78 verknüpften Nucleotiden, einem Molekulargewicht von 51000 g/Mol und

einer Sedimentationskonstante von 3 S angegeben wurde. Da wahrscheinlich 75 Nucleotide eines Messengers auf 1 Ribosom kommen, würde gerade eine Poly U-Kette dieses Präparats an ein Ribosom gebunden werden. Die Messenger-aktivität betrug deshalb auch nur den zehnten Teil der Aktivität eines Präparats, das als 7 S-Partikel sedimentierte und bei einem Molekulargewicht von 390000 g/Mol 600 Nucleotide pro Poly U-Kette besaß. Diese Untersuchungen sind mit einem E. coli-System in Gegenwart von 17,5 mMol Mg^{++} /l durchgeführt worden.

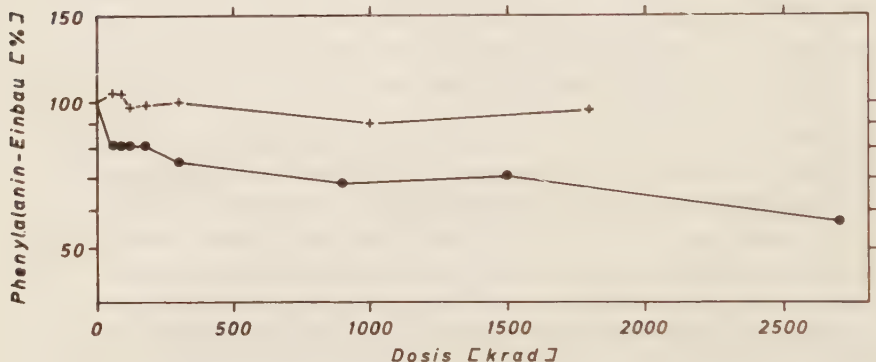


Abb. 38

Inaktivierung von Poly U durch Röntgenbestrahlung mit verschiedenen Dosen, gemessen am Phenylalanin-Einbau in mit heißer TCA fällbare Proteine zweier Saccharomyces-Systeme.

Poly U während der Bestrahlung in 2-Mercaptoäthanol-freiem Puffer (1 mg/ml TMA IV).

Mg^{++} -Konzentration im Reaktionsgemisch: 23,3 mMol/l.

Inkubation 60 Min bei 30°C. Ansätze zu 0,6 ml enthielten:

in mg: Ribosomen-Proteine ($RF_{TMA II}$): 1,3 - 1,7;

Enzyme ($EF_{G75, TMA II}$): 1,2 - 1,8 ;

tRNS: 0,125; PEP-Kinase: 0,01; Poly U: 0,05;

in μ Mol: ATP: 1,18; GTP: 1,15; PEP: 4,85;

Tris ac pH 7,5: 18; Merc: 0,55; Mg ac: 14;

NH_4Cl : 13,2; ^{14}C -Phe (48,5 C/Mol): 0,01.

4.2.5 Diskussion der durch Röntgenbestrahlung hervorgerufenen Inaktivierung des zellfreien Systems

Die Wirkung der Röntgenstrahlen auf das Protein synthetisierende System läßt sich in Dosiseffektkurven darstellen. Sie geben den Logarithmus des nach der Inaktivierung verbleibenden, relativen Aminosäureeinbaus an in seiner Abhängigkeit von der Strahlendosis.

Die im Rahmen dieser Untersuchung gefundenen Kurven zeigen den für die Inaktivierung von Stoffwechselprozessen allgemein bekannten Verlauf.

Bei Applizierung sehr geringer Dosen war in einigen Fällen eine Stimulierung der Proteinsynthese zu beobachten.

Nach Bestrahlung mit sehr hohen Dosen scheint den Ribosomen noch eine Restaktivität von etwa 10 % zu verbleiben. Bei gleicher Dosis wurden allerdings die Enzyme weniger geschädigt als die Ribosomen.

Die weniger ausgeprägte strahleninduzierte Inaktivierung eines Systems, das bereits unbestrahlt nur geringe Proteinsynthese zeigte, läßt vermuten, daß in Ribosomen und Enzymen sowohl durch Bestrahlung als auch durch Alterung gleich wirkende strukturelle Veränderungen hervorgerufen werden. Welcher Art diese Veränderungen sind, kann nach den vorliegenden Ergebnissen nicht gesagt werden.

4.3 Mikrokalorimetrische Untersuchungen

Mikrokalorimetrische Methoden wurden bisher hauptsächlich zur Messung von Wärmetönungen definierter chemischer Reaktionen oder lebender Organismen herangezogen (13,19). Thermodynamische Daten zum Stoffwechsel von *Saccharomyces* wurden bei in vivo-Versuchen von LAMPRECHT (114) im Institut für Biophysik gewonnen. Teilschritte von Stoffwechselprozessen werden erst neuerdings mikrokalorimetrisch untersucht. Diese Methode eröffnet auch für die Proteinbiosynthese in vitro weiterreichendere Möglichkeiten zum Studium von Teilreaktionen, als sie durch Anwendung radioaktiv-markierter Vorstufen gegeben sind.

In dieser Arbeit wurde der Wärmeumsatz an einem Polyphenylalanin synthetisierenden System von *Saccharomyces* unter Variation verschiedener Parameter gemessen.

4.3.1 Methode

Die Untersuchungen erfolgten mit einem Mikrokalorimeter von E. Calvet mit 4 Kammern zu 15 ml Inhalt. Dieses Gerät stellt einen Wärmeflußmesser dar, dessen Empfindlichkeit zwischen 40 und 250 mcal/h·cm betrug.

Da beim Einführen der Reaktionsgefäße in das Kalorimeter Reibungswärme entsteht und vor Beginn der Messung das Temperaturgleichgewicht abgewartet werden muß, kann erst nach 1 h die Reaktion im Kalorimeter gestartet werden. Deshalb befanden sich die Ribosomenfraktion und das energieliefernde System getrennt in zwei 0,5 ml fassenden Nöpfchen im Hauptreaktionsgefäß über den übrigen Reaktionspartnern. Die Gefäße waren aus Plexiglas gefertigt.

Durch Absenken der Nöpfchen wurde die Reaktion in Gang gesetzt und durch mehrfaches Auf- und Abbewegen für eine gute Durchmischung gesorgt.

Da bis zum Erreichen des Temperaturgleichgewichtes die zellfreien Fraktionen bei 30°C irreversibel geschädigt werden (Kap. 3.5), erfolgten die mikrokalorimetrischen Untersuchungen bei 20°C. Nach Abklingen der ersten Reaktion konnten bestimmte Faktoren, die dem Reaktionsgemisch zunächst gefehlt hatten, von außen durch einen Schlauch zugeführt werden und somit weitere Reaktionen auslösen.

4.3.2 Ergebnisse

Im kompletten System laufen nacheinander verschiedene Reaktionen ab, die sich in zwei ausgeprägten "peaks" manifestieren (Abb. 39a). Einen Hinweis zur Interpretation dieses Reaktionsverlaufs gibt ein weiterer Versuch, bei dem die zunächst ausgesetzten Ribosomen nach Abklingen der ersten Reaktion zugesetzt wurden (Abb. 39b). Der daraufhin sogleich einsetzende Wärmefluß spricht für Proteinsynthese, da nun alle zum Ablauf der Proteinsynthese essentiellen Faktoren vorhanden sind. Der erste "peak" dürfte für die Aktivierung und Übertragung der Aminosäuren auf tRNS stehen, denn diese Reaktionen sind lediglich an die Gegenwart von tRNS, Aminosäuren, ATP und Enzymfraktion gebunden. Die Deutung als Mischungswärme ist auszuschließen, wie aus Abb. 40 zu ersehen ist. Lediglich im ersten spitzen "peak" werden Mischungs- und Reibungswärmen registriert. Einen Beweis dafür, daß alle an der Proteinsynthese beteiligten Reaktionen an die Zufuhr von Energie gebunden sind, gibt Abb. 39c: Bei fehlendem energieliefernden System sind keine Umsetzungen festzustellen, die jedoch nach Zugabe der entsprechenden energieliefernden Substanzen sogleich ablaufen. In der Enzymfraktion spielen sich auch unter Energiezufuhr keine meßbaren Prozesse ab (Abb. 39d). Daher liegt die Annahme nahe, daß der Hauptwärmeumsatz auf die Proteinsynthese zurückzuführen ist.

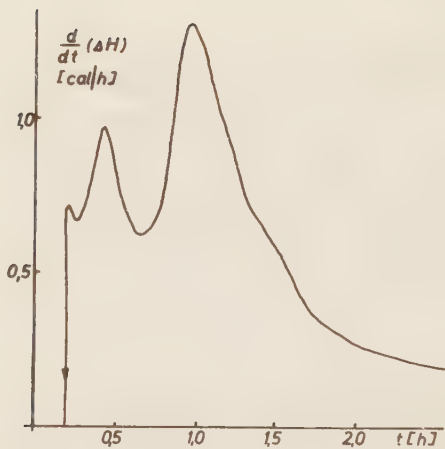


Abb. 39a

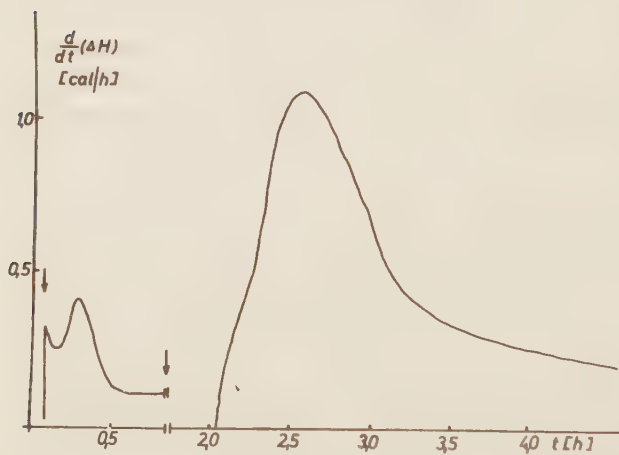


Abb. 39b

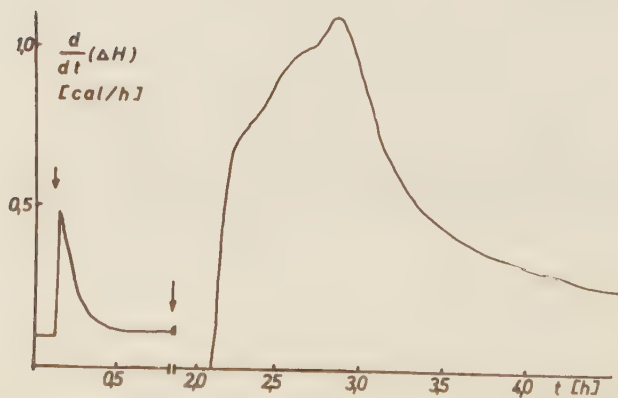


Abb. 39c

Abb. 39a - d: Mikrokalorimetrische Messungen des Ablaufs der Proteinsynthese in einem zellfreien Saccharomyces-System.

Mg⁺⁺-Konzentration im Reaktionsgemisch: 23,3 mM.

Inkubation bei 20°C.

Ansätze zu 6 ml Endvolumen enthielten (komplettes System):

in mg: Ribosomen-Proteine (RF_{TMA II}): 30;
Überstands-Enzyme (EF_{G75, TMA II}): 10,2;
Poly U: 0,5; tRNS: 1,25;
PEP-Kinase: 0,1;
in μ Mol: ATP: 11,8; GTP: 11,5; PEP: 48,5;
Tris ac pH 7,5: 180; Merc: 6;
Mg ac: 140; NH₄Cl: 132;
¹⁴C-Phe (48,5 C/Mol): 0,1.

a: Komplettes System

b: Ansatz zunächst ohne Ribosomen, Zusatz der Ribosomen nach 105 Min.

c: Ansatz zunächst ohne energielieferndes System, Zusatz des energieliefernden Systems nach 105 Min.

d: Enzymfraktion mit energielieferndem System.

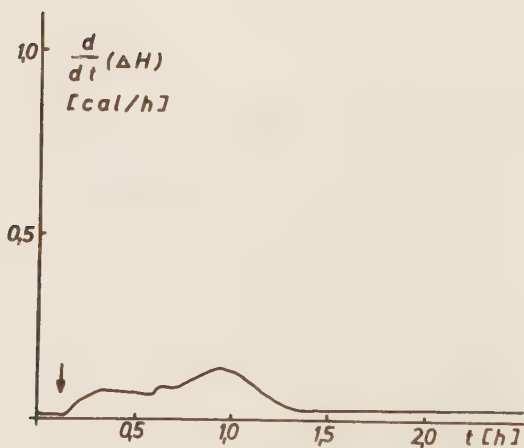


Abb. 39d

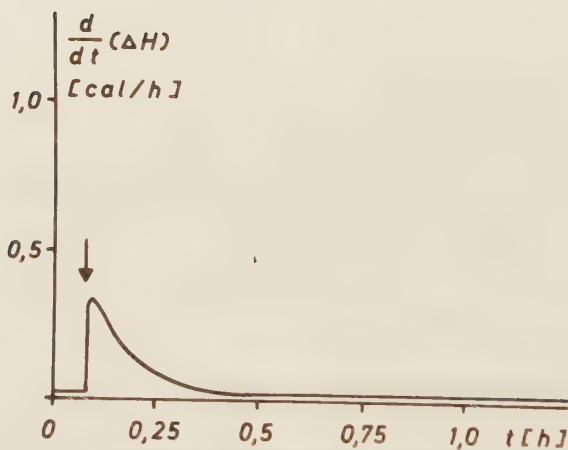


Abb. 40

Mikrokalorimetrische Messung von Mischungs- und Reibungswärme beim Vermischen von Ribosomenfraktion mit Pufferlösung.

Temperatur: 30°C .

Ribosomen-Proteine: 19 mg in 0,5 ml.

Standard-Puffer TMA II: 5,5 ml.

5. DISKUSSION

Protein synthetisierende zellfreie Systeme sind aus einer Reihe verschiedener Organismen und Organelle pflanzlicher als auch tierischer Herkunft präpariert worden. Darunter befinden sich jedoch nur wenige Hefesysteme. Eine Ursache dafür mag in der Schwierigkeit zu suchen sein, ein genügend arbeitsfähiges in vitro- System herzustellen, das Aussagen über den Mechanismus der Proteinsynthese bei Eucaryoten zuläßt. Aus Bakterien (vorzugsweise Escherichia coli) präparierte zellfreie Systeme synthetisieren ein Vielfaches mehr an Protein als ein Hefesystem. Die Bevorzugung dieser Objekte liegt auf der Hand.

5.1. Vergleich verschiedener Protein synthetisierender in vitro-Systeme

Eine vergleichende Darstellung über zellfreie Polyphenylalanin synthetisierende Systeme aus verschiedenen Organismen zeigt Tab. 22. Auffallend ist dabei die bessere Proteinsynthese in Systemen aus kernlosen Organismen, wie aus Bakterien, Mitochondrien und Reticulocyten. Da beim Homogenisieren auch die Zellkerne der Eucaryoten zerstört werden, ließe sich aus deren weniger aktiven zellfreien Systemen folgern, daß an der Formation von aktiven Polysomenkomplexen auch Strukturelemente der Kernmembranen beteiligt sind.

Die bisher bekannten Ergebnisse mit Hefesystemen beziehen sich ausschließlich auf die Aminosäurepolymerisation an endogenem und künstlichem Messenger. Die Aminosäureeinbauraten und die Abhängigkeiten von essentiellen Faktoren der einzelnen Systeme sind in Tab. 21a/b zusammengestellt. Die endogene Messengeraktivität erweist sich als sehr gering. Von den synthetischen Polynucleotiden ist Poly U am wirksamsten.

	1		2		3		4	
	a (Phe)	b	a (Phe)	b	a (Phe)	b	a (Lys)	b
a: pMol Aminosäure/mg Ribosomen-Protein eingebaut	20 - 80	100	20 - 90	100	355	100	15	100
b: % Einbau								
Komplettes System								
minus Poly U bzw. Poly A		5 - 35		22		11		65
minus tRNS		76 - 93						
minus GTP		60 - 110				6		11
minus energielie- ferndes System		1 - 21		7				
minus Enzyme		2 - 30		18		1		
minus Ribosomen		1 - 22		0		10		0
minus Mg ⁺⁺						15		8
minus NH ₄ ⁺						3		3
plus Puromycin	25 - 47			21				35
plus Chloramphenicol	69 - 90			95				81
plus RNase						59		
plus DNase	10			5		95		
				92				

Tab. 21a: Zellfreie von Poly U stimulierte Hefesysteme.

- 1: Diese Arbeit
 2: BRETHAUER et al. (26)
 3: HEREDIA et al. (87)
 4: DOWNEY et al. (52)

Autor	
Diese Arbeit	0,4 pMol Phe/mg Ribosomen-Protein
MAEDA et al (125)	0,1 pMol Leu/mg Ribosomen-Protein
SO et al. (188)	0,24 pMol Phe/mg Ribosomen-Protein
"	0,44 pMol Leu/mg Ribosomen-Protein

Tab. 21b: Proteinsynthese in zellfreien Hefesystemen an endogenem Messenger.

Objekt	Proteinsynthese an Poly U
Escherichia coli (1)	5500 pMol Phe/mg Protein
Neurospora crassa (2)	95 pMol Phe/mg RNS
Rattenreticulocyten (3)	2100 pMol Phe/mg Ribosomen-Protein
Menschliche Zellen (4)	454 pMol Phe/mg Ribosomen-Protein
Chloroplasten aus Euglena fragilis (5)	397 pMol Phe/mg Chloroplasten-RNS
Mitochondrien aus Xenopus laevis (6)	1200 pMol Phe/mg RNS des Extraktes
Saccharomyces Stamm 211 (7)	80 pMol Phe/mg Ribosomen-Protein

Tab. 22: Proteinsynthese in von Poly U stimulierten zellfreien Systemen aus verschiedenen Organismen

- 1) DOERFLER et al. (51)
- 2) KÜNTZEL (112)
- 3) WEINSTEIN et al. (214)
- 4) PERANI et al. (160)
- 5) EISENSTADT et al. (55)
- 6) SWANSON et al. (193)
- 7) Diese Arbeit

In dieser Arbeit ist nun die Darstellung eines Protein synthetisierenden zellfreien Hefesystems gelungen, das mit Hefe- und Kalbsthymus-DNS als Prägersubstanz arbeitet. Dieser Befund läßt auf eine weitere Optimierung des in vitro-Systems hoffen. Für den Phenylalanin-Einbau eines mit Kalbsthymus-DNS arbeitenden Systems wurden sogar unter gleichen Bedingungen höhere Werte gefunden als für ein Poly U-abhängiges System. Da die von Poly U codierten Polypeptide aus-

schließlich Phenylalanin enthalten, während in natürlichen Proteinen Phenylalanin neben 19 weiteren Aminosäuren nur zu einem bestimmten Anteil vorkommt, ist dieser Befund besonders bemerkenswert. Die Stimulierung der Proteinsynthese im Hefesystem mit DNS aus Eucaryoten (Hefe, Kalbsthymus) sowie das auch in dieser Arbeit nachgewiesene Ausbleiben einer solchen Stimulierung im zellfreien System aus *Escherichia coli* (181,201), bestätigen die Spezifität eucaryotischer und procaryotischer Systeme. In Übereinstimmung hiermit stimulieren DNS aus Bakterien und Phagen das in vitro-System aus *Escherichia coli*.

Allerdings wird in keinem Falle mit RNS-Polymerase aus *Escherichia coli* die Transkription sowohl an Procaryoten- als auch an Eucaryoten-DNS gestört (181). Die spezifischen Wechselwirkungen scheinen demnach zwischen mRNS und Ribosomen zu bestehen, an denen Überstandsfaktoren nicht beteiligt sind, wie entsprechende Versuche am *E. coli*-System demonstrieren (88,181). Auch die Aminoacylierung der tRNS ist an Enzyme aus homologen Systemen gebunden (14,226), wohl aber können an Reticulocyten-Ribosomen intakte Proteine synthetisiert werden, wenn die angebotene tRNS aus *E. coli* bereits aminoacyliert war (53).

Überkreuzversuche mit Ribosomen und Überstandsenzymen aus Hefe und Bakterien bestätigen die Nichtaustauschbarkeit dieser Fraktionen zwischen Eukaryoten und Prokaryoten (87, 188). Wie ein Eucaryot verhalten sich allerdings in Austauschexperimenten die Blaualgen (68,70,89,181), obwohl sie morphologisch zu den Procaryoten zu stellen sind. Die in der vorliegenden Arbeit in einigen Fällen registrierte Stimulierung der Proteinsynthese des Hefesystems durch DNS des T_4 -Phagen muß nicht im Widerspruch zu der allgemein gültigen Regel der Spezifität der Eukaryoten- und Prokaryoten-Systeme stehen, da eine Verunreinigung der cytoplasmatischen Ribosomen-Fraktion mit Mitochondrienribosomen anzunehmen ist. Dies tritt besonders dann ein, wenn die Hefen unter starker Belüftung gezüchtet wurden,

da die Mitochondrienentwicklung unter aeroben Bedingungen besonders optimal verläuft. Dennoch dürfte der prozentuale Anteil der Mitochondrienribosomen an der cytoplasmatischen Ribosomen-Fraktion gering sein. Es überrascht daher die dreifache Stimulierung der Protein-Synthese durch T_4 -Phagen-DNS. Eine Erklärung mag in der vergleichsweise höheren Aktivität der Mitochondrien-Ribosomen zu den cytoplasmatischen Ribosomen zu suchen sein.

Einen weiteren Hinweis auf Mitochondrien-Ribosomen gibt die Inhibierung der Polyphenylalaninsynthese durch Chloramphenicol, das als spezifischer Inhibitor für Prokaryoten bekannt ist.

Diese Befunde bestätigen erneut den bakterienähnlichen Charakter der Mitochondrien.

5.2 Röntgenbestrahlung

Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf Stoffwechselprozesse ist mehrfach untersucht worden. So ist bekannt, daß RNS-(194) und Proteinbiosynthese (104) in *Saccharomyces* im Gegensatz zur DNS-Synthese stark strahlenresistent sind, wenn der Stoffwechsel unmittelbar nach der Bestrahlung betrachtet wird. Erst nach einer deutlichen Verzögerung können Hemmungen dieser beiden Prozesse konstatiert werden. Die Proteinbiosynthese in vivo zeigte sogar unmittelbar und bis zu 2 h nach der Bestrahlung eine teilweise Stimulierung, die in der vorliegenden Arbeit in einigen Fällen auch im in vitro-System bei kleinen Dosen beobachtet werden konnte.

Die späte Inhibierung der Proteinbiosynthese in vivo zeigt, daß die Komponenten der Translation relativ strahlenresistent sind und die eigentlichen strahleninduzierten Veränderungen in der DNS zu suchen sind. Basenveränderungen, Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNS führen durch die Transkription auch zu veränderter RNS, wobei mRNA den Einbau falscher Aminosäuren in Proteine steuert oder es früh-

zeitig zu einem Abbruch der Proteinkette kommt. Diese Proteine (Enzyme) aber sind funktionsgestört. Da für eine gewisse Zeit nach der Bestrahlung noch genügend aktive Enzyme in der Zelle vorhanden sind, um den Stoffwechsel aufrecht zu erhalten, manifestiert sich demnach ein Strahlenschaden an den Proteinen erst, wenn an der geschädigten DNS neue mRNS-Moleküle synthetisiert worden sind.

Einen Beweis für die Richtigkeit dieser Theorie liefert die strahleninduzierte Inaktivierung der zellfreien Komponenten des Saccharomyces-Systems. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, sind sowohl die Ribosomen als auch die Überstandsenzyme relativ resistent und es bedarf sehr hoher Dosen, um die Proteinsynthese zu inaktivieren. Dabei fällt eine Korrelation zwischen dem Grad der Inaktivierung durch Röntgenstrahlen und dem Aktivitätsverlust bei Alterung auf. Je inaktiver das zellfreie System vor der Bestrahlung bereits war, desto weniger konnte die Proteinsynthese durch Röntgenbestrahlung gehemmt werden. Dieser Befund spricht für gleichwirkende strukturelle Veränderungen, die sowohl durch Bestrahlung als auch durch Alterung hervorgerufen werden.

Für weitere Versuche am zellfreien System ist die Inaktivierung der DNS-abhängigen-mRNS-gesteuerten Proteinsynthese durch bestrahlte DNS anzustreben. Der Strahlenschaden müßte sich in diesem Falle unmittelbar auf die Proteinsynthese auswirken.

5.3. Mikrokalorimetrie

Mit der Mikrokalorimetrie bietet sich eine Methode an, energieverbrauchende Umsetzungen während der Proteinsynthese unmittelbar zu studieren. Ein Wärmefluß von etwa 1 cal/h bei der Bruttoreaktion ist gut meßbar. Aus ersten Versuchen kann der zweiphasige Reaktionsablauf als Aminoacylierung der tRNS mit nachfolgender Polypeptidisierung gedeutet werden. Eine eingehende Untersuchung von Teilprozessen der Proteinsynthese bleibt weiteren Versuchen vorbehalten. Dazu ist eine Fraktionierung der Überstandsenzyme und eine Reinigung der Ribosomen von Proteinsynthesefaktoren erforderlich. Durch gezielte Zugabe von bestimmten Komponenten zu einem bereits arbeitenden Reaktionsgemisch ließen sich einzelne Reaktionsschritte verfolgen. Besonders geeignet müßte diese Methode für die Bestimmung des Wirkungsortes von Antibiotika sein. Zur Klärung der Frage nach der Anzahl der bei der Proteinsynthese hydrolytisch gespaltenen GTP-Moleküle und der Spezifität der verschiedenen an der Proteinsynthese beteiligten Faktoren dürfte die Mikrokalorimetrie einen Beitrag leisten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit bestand in der Präparation eines aktiven Protein synthetisierenden zellfreien Systems aus *Saccharomyces* Stamm 211.

Folgende optimale Bedingungen für die Isolierung der zellfreien Komponenten und die Zusammensetzung der Reaktionsgemische wurden ermittelt:

1. Das Ernten der Hefezellen soll am Ende der logarithmischen Wachstumsphase vorgenommen werden.
2. Zur Gewinnung der zellfreien Fraktionen bewährt sich die Homogenisation mit Glasperlen und anschließende Zentrifugation des Homogenisats bei verschiedenen Beschleunigungen.
3. Eine Reinigung der Überstandsenzyme ist unerlässlich. Dabei erweist sich eine Fraktionierung an Sephadex G 75 als günstig.
4. Ribosomen können entweder in Standardpuffer gewaschen oder in Untereinheiten dissoziiert und unter geeigneten Bedingungen reassoziert werden. Sowohl eine Dialyse gegen Puffer mit niedrigem Mg^{++} -Gehalt als auch gegen KCl-haltigen Puffer eignen sich in gleicher Weise zur Dissoziation. Solche Ribosomen-Präparate bewähren sich im DNS-abhängigen zellfreien System.
5. Da die Haltbarkeit der zellfreien Fraktionen zu wünschen übrig läßt, wäre die Möglichkeit des Einfrierens in flüssigem Stickstoff anzustreben.
6. Ein maximaler Phenylalanin-Einbau ist bei 20 mMol Mg^{++} /l zu beobachten. Ein kleinerer Anteil der Reaktionen läuft dagegen bevorzugt bei 8,5 mMol Mg^{++} /l ab. Diese Reaktionen unterscheiden sich voneinander darin, daß bei geringer Magnesiumkonzentration der Start der Proteinsynthese an die Gegenwart von Initiator-tRNS gebunden ist, während ein höherer Magnesiumgehalt diese tRNS zu ersetzen vermag.

Auch für die Abhängigkeit des Phenylalanin-Einbaus von der tRNS-Konzentration besteht ein Maximum. Für alle übrigen Faktoren existieren Sättigungskurven. Als limitierender Faktor für die Proteinsynthese wurden die Ribosomen gewählt.

Als ein Mittel zur Charakterisierung der Ribosomen-Präparate diente die Dichtegradienten-Zentrifugation.

Von den erprobten synthetischen Polynucleotiden war nur Poly U als Messenger brauchbar. Das in Protein eingebaute Phenylalanin belief sich maximal auf 175 pMol Phe/mg Ribosomen-Protein. Für diese Systeme waren Poly U, energieliefernde Substanzen, Enzyme und Ribosomen essentiell. Puromycin wirkte inhibierend. Die Menge des an tRNS gebundenen Phenylalanins betrug etwa ein Drittel des Phenylalanin-Einbaus in Protein.

Durch Dissoziation und Reassoziaton von Ribosomen ließ sich deren Wirksamkeit in einem DNS-abhängigen System verbessern. Hefe- und Kalbsthymus-DNS bewirkten eine bis zu 11-fache Stimulierung der Proteinsynthese. DNS des Phagen T₄ erwies sich dagegen als indifferent. Lediglich in Systemen aus Hefen, die unter starker Belüftung gezüchtet worden waren, ließ sich ein geringer Einfluß auf die Proteinsynthese feststellen. Es wird vermutet, daß neben den cytoplasmatischen Ribosomen noch den Bakterien ähnliche Mitochondrien-Ribosomen in der zellfreien Fraktion vorhanden sind. Diese Annahme wird damit begründet, daß die Entwicklung der Mitochondrien unter Sauerstoffzufuhr stark begünstigt wird und sich somit der Anteil der Mitochondrien-Ribosomen entsprechend erhöht. Einen weiteren Hinweis für eine Beteiligung von Mitochondrien-Ribosomen an der Polyphenylalaninsynthese gibt die hemmende Wirkung von Chloramphenicol, das lediglich als Inhibitor für Bakterien-Systeme bekannt ist.

Ein Protein synthetisierendes zellfreies System aus Escherichia coli wurde durch T₄-Phagen-DNS stimuliert, sprach aber nicht auf DNS aus Hefe oder Kalbsthymus an.

Röntgenbestrahlung der zellfreien Fraktionen wirkte sich inhibierend auf die Proteinsynthese aus. Allerdings mußten sehr hohe Dosen appliziert werden. In einigen Fällen war bei geringen Dosen eine leichte Stimulierung festzustellen. Der Grad der strahleninduzierten Inaktivierung war desto geringer je inaktiver sich das zellfreie System vor der Bestrahlung zeigte. Daraus wird gefolgert, daß sowohl Röntgenstrahlen als auch Alterung gleich wirkende strukturelle Veränderungen hervorrufen.

Über die Art dieser Veränderungen kann jedoch keine Aussage gemacht werden. Bestrahlte wie unbestrahlte Ribosomen zeigen gleiches Sedimentationsverhalten, lediglich in NH_4Cl behandelte Ribosomen spalten nach Bestrahlung leichtes Material ab. Durch dieses Reinigungsverfahren werden offensichtlich Faktoren von den Ribosomen abgewaschen, die strukturstabilisierend wirken.

Röntgenbestrahlung von Poly U hat kaum einen inhibierenden Einfluß auf dessen Messenger-Funktion.

Als eine neue Methode für das Studium der Proteinsynthese wurde die Mikrokolorimetrie getestet. Es konnte gezeigt werden, daß durch Wärmeflußmessungen auch die Möglichkeit besteht, energieverbrauchende Teilschritte der Proteinsynthese unmittelbar zu verfolgen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Adams, J.M., J. Mol. Biol. 33 (1968) 571
2. Adams, J.M., Capecchi, M.R., Proc. Nat. Acad. Sci. 55 (1966) 147
3. Albrecht, U., Klink, F., Richter, D., Z. Naturforschg. 25b (1970) 285
4. Allende, J.E., Seeds, N.W., Conway, T.W., Weissbach, H., Proc. Nat. Acad. Sci. 58 (1967) 1566
5. Allende, J.E., Weissbach, H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 (1967) 82
6. Arca, M., di Mauro, E., Frontali, L., Tecce, G., European J. Biochem. 5 (1968) 466
7. Attardi, G., Ann. Rev. Microbiol. 21 (1967) 383
8. Averbek, D., Diss. Math.-Naturw. Fak. Freie Univer. Berlin 1970
9. Avery, O.T., Macleod, C.M., McCarty, M., J. exptl. Medicine 79 (1944) 137
10. Ayuso, M.S., Heredia, C.F., European J. Biochem. 7 (1968) 111
11. Barnett, L.B., Frens, G., Koningsberger, V.V., Biochem. J., 84 (1962) 89p
12. Bayley, S.T., Griffiths, E., Biochem. 7 (1968) 2249
13. Belaich, J.-P., C.R. Soc. Biol. 157 (1963) 316
14. Benzer, S., Weisblum, B., Proc. Nat. Acad. Sci. 47 (1961) 1149
15. Berg, P., Ofengand, E.J., Proc. Nat. Acad. Sci. 44 (1958) 78
16. Bielka, H., Welfle, H., Böttger, M., Förster, W., European J. Biochem. 5 (1968) 183
17. Bielka, H., Molekulare Biologie der Zelle, Gustav Fischer Verlag Stuttgart, S. 420
18. Bishop, J., Leahy, J., Schweet, R., Proc. Nat. Acad. Sci. 46 (1960), 1030
19. Boivinnet, P., Theses présentées a la Faculté des Sciences de l'Université d'Aix-Marseille (1964)

20. Bonanou, S.A., Arnstein, H.R.V., FEBS Letters
3 (1969) 348
21. Booyse, F.M., Rafelson jr., M.E., Biochim. Biophys.
Acta 166 (1968) 689
22. Brachet, J., Arch. Biol. 53 (1942) 207
23. Bremer, H., Yuan, D., J. Mol. Biol. 38 (1968) 163
24. Brenner, S., Stretton, A.O., Kaplan, S.,
Nature 206 (1965) 994
25. Bretscher, M.S., J. Mol. Biol. 34 (1968) 131
26. Bretthauer, R.K., Marcus, L., Chaloupka, J.,
Halvorsen, H.O., Bock, R.M., Biochem. 2 (1963) 1079
27. Brown, J.C., Smith, A.E., Nature 226 (1970) 610
28. Brunning, G., Ph. D. Thesis, Univ. Wisc. 1964
29. Bryan, R.N., Sugiura, M., Hayashi, M., Proc. Nat. Acad.
Sci. 62 (1969) 483
30. Bunn, C.L., Mitchell, C.H., Lukins, H.B., Linnane, A.W.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 67 (1970) 1233
31. Busiello, E., di Girolamo, M., Felicetti, L.,
Biochim. Biophys. Acta 228 (1971) 289
32. Cannon, M., FEBS Letters 8 (1970) 217
33. Capecchi, M.R., Proc. Nat. Acad. Sci. 58 (1967) 1144
34. Caspersson, T., Naturw. 29 (1941) 33
35. Chae, Y.-B., Mazumder, R., Ochoa, S., Proc. Nat. Acad.
Sci. 63 (1969) 828
36. Chambers, D.A., Dubay, G., Proc. Nat. Acad. Sci.
63 (1969) 118
37. Chesters, J.K., J. Protozool. 15 (1968) 509
38. Ciferri, O., Parisi, B., Perani, A., Grandi, M.,
J. Mol. Biol. 37 (1968) 529
39. Clark, B.F.C., Marcker, K.A., J. Mol. Biol.
17 (1966) 394
40. Clegg, J.C.S., Arnstein, H.R.V., European J. Biochem.
13 (1970) 149

41. Coleman, G., Biochim. Biophys. Acta 142 (1967) 558
42. Cooper, W.K., Muramatsu, K., Wannemacher jr., R.W.,
Biochim. Biophys. Acta 169 (1968) 269
43. Cox, R.F., Mathias, A.P., Biochem. J. 115 (1969) 777
44. Crick, F.H.C., Symp. Soc. Exp. Biol. 12 (1958) 138
45. Crick, F.H.C., Barnett, L., Brenner, S., Watts-Tobin, R.J.,
Nature 192 (1961) 1227
46. Crick, F.H.C., J. Mol. Biol. 19 (1966) 548
47. Davies, J.W., Biochim. Biophys. Acta 174 (1969) 686
48. Dickerman, H.W., Steers, E., Redfield, B.G.,
Weissbach, H., J. Biol. Chem. 242 (1967) 1522
49. Dietz, G.W., Ried, B.R., Simpson, W.V., Biochem. 4
(1965) 2340
50. Dintzis, H., Proc. Nat. Acad. Sci. 47 (1961) 247
51. Doerfler, W., Zillig, W., Fuchs, E., Albers, M.,
Hoppe-Seyler's Zeitschr. physiol. Chem. 330
(1962) 96
52. Downey, K.M., So, A.G., Davie, W., Biochem. 4 (1965) 1702
53. v.Ehrenstein, G., Lipmann, F., Proc. Nat. Acad. Sci.
47 (1961) 941
54. Eichenberger, W., Chimia 23 (1969) 85
55. Eisenstadt, J.M., Brawerman, G., J. Mol. Biol. 10
(1964) 392
56. Eker, A.P.M., Berends, W., Biochim. Biophys. Acta
217 (1970) 527
57. Ekert, B., Pattein, A., Int. J. Radiat. Biol. 17
(1970) 47
58. Elias, H.-G., Ultrazentrifugen-Methoden Beckman
Instruments, München 1961
59. Erbe, R.W., Leder, P., Biochem. Biophys. Res. Commun.
31 (1968) 798
60. Ertel, R., Redfield, B., Brot, N., Weissbach, H.,
Arch. Biochem. Biophys. 128 (1968) 331
61. Fahr, E., Angew. Chem. 81 (1969) 581

62. Falvey, A.K., Staehelin, T., J. Mol. Biol. 53
(1970) 1
63. Falvey, A.K., Staehelin, T., J. Mol. Biol. 53
(1970) 21
64. Fauman, M., Rabiwitz, M., Getz, G.S., Biochim.
Biophys. Acta 182 (1969) 355
65. Flessel, C.P., Biochem. Biophys. Res. Commun. 32
(1968) 438
66. Frederick, E.W., Maitra, U., Hurwitz, J.,
J. Biol. Chem. 244 (1969) 413
67. Fuchs, E., Millette, R.L., Zillig, W., Walter, G.,
European J. Biochem. 3 (1967) 183
68. Galling, G., Z. Naturforschg. 22b (1967) 348
69. Galling, G., Z. Naturforschg. 22b (1967) 687
70. Galling, G., Z. Naturforschg. 24b (1969) 321
71. Georgiev, G.P. J. Theoret. Biol. 25 (1969) 473
72. Gilbert, W., J. Mol. Biol. 6 (1963) 374
73. Gilbert, W., J. Mol. Biol. 6 (1963) 389
74. Godin, C., Kruh, J., Dreyfus, J.C., Biochim. Biophys.
Acta 182 (1969) 175
75. Gold, L.M., Schweiger, M., J. Biol. Chem. 244
(1969) 5100
76. Gold, L.M., Schweiger, M., Proc. Nat. Acad. Sci.
62 (1969) 892
77. Gold, L.M., Schweiger, M., J. Biol. Chem. 245
(1970) 2255
78. Goldstein, J.L., Beaudet, A.L., Caskey, C.T.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 67 (1970) 99
79. Goldstein, J.L., Caskey, C.T., Proc. Nat. Acad. Sci.
67 (1970) 537
80. Gonzales, N.S., Bade, E.G., Algranati, I.D.,
FEBS Letters 4 (1969) 331
81. Gordon, J., Proc. Nat. Acad. Sci. 58 (1967) 1574
82. Gordon, J., J. Biol. Chem. 244 (1969) 5680

83. Gros, F., Hiatt, H., Gilbert, W., Kurland, C.G.,
Risebrough, R.W., Watson, J.D., *Nature* 190 (1961) 581
84. Haenni, A.-L., Lucas-Lenard, J., *Proc. Nat. Acad. Sci.*
61 (1968) 1363
85. Hamada, K., Yang, P., Heintz, R., Schweet, R.,
Arch. Biochem. Biophys. 125 (1968) 598
86. Hawthorne, D.C., *J. Mol. Biol.* 43 (1969) 71
87. Heredia, C.F., Halvorson, H.O., *Biochem.* 5 (1966) 946
88. Herrlich, P., Schweiger, M., Zillig, W., Lang, N.,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 348 (1967) 1207
89. Herrlich, P., Schweiger, M., Zillig, W.,
VII. Int. Congr. Biochem., Tokyo 1967
90. Hershey, J.W.B., Monro, R.E., *J. Mol. Biol.* 18 (1966) 68
91. Heywood, S.M., *Nature* 225 (1970) 696
92. Heywood, S.M., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 67 (1970) 1782
93. Hoagland, M.B., Zamecnik, P.C., Stephenson, M.L.,
Biochim. Biophys. Acta 24 (1957) 215
94. Hoagland, M.B., Stephenson, M.L., Scott, J.F., Hecht, L.J.,
Zamecnik, P.C., *J. Biol. Chem.* 231 (1958) 241
95. Hoagland, M., (1960) in *The Nucleic Acids*, Hrsg.
E. Chargaff und J.N. Davidson
96. Hoerz, W., McCarty, K.S., *Biochim. Biophys. Acta*
228 (1971) 526
97. Holz, H., *Diplomarbeit am Institut für Biophysik der
Freien Universität Berlin*, 1971
98. Horstmann, H.J., *Z. Biol.* 116 (1968) 1
99. Huston, R.L., Schrader, L.E., Honold, G.R., Beecher, G.R.,
Cooper, W.K., Sauberlich, H.E., *Biochim. Biophys.*
Acta 209 (1970) 220
100. Iwasaki, K., Sabol, S., Wahba, A.J., Ochoa, S.,
Arch. Biochem. 125 (1968) 542
101. Jacob, F., Monod, J., *J. Mol. Biol.* 3 (1961) 318
102. Janda, persönliche Mitteilung
103. Jannsen, S., Lochmann, E.-R., Laskowski, W.,
Z. Naturforschg. 23b (1968) 1500

104. Jannsen, S., Diss. Math.-Naturw. Fak. Freie Univer.
Berlin 1969
105. Kato, T., Tamaoki, T., Biochim. Biophys. Acta 182
(1969) 250
106. Kelley, W.S., Schaechter, M., J. Mol. Biol. 50
(1970) 171
107. Ko, T.S., Barnett, L.B., Proc. Soc. exp. Biol.
127 (1968) 114
108. Kolakofski, D., Nakamoto, T., Proc. Nat. Acad. Sci.
56 (1966) 1786
109. Krisko, I., Gordon, J., Lipmann, F., J. Biol. Chem.
244 (1969) 6117
110. Kućan, Z., Radiat. Res. 27 (1966) 229
111. Kućan, Z., Croat. chem. Acta 38 (1966) 97
112. Küntzel, H., FEBS Letters 4 (1969) 140
113. Lamborg, M.R., Zamecnik, P.C., Biochim. Biophys. Acta
42 (1960) 206
114. Lamprecht, I., Diss. Math.-Naturw. Fak. Freie Univer.
Berlin (1969)
115. Laskowski, W., Z. Naturforschg. 15b (1960) 495
116. Laskowski, W., Z. Naturforschg. 17b (1962) 93
117. Laskowski, W., Lochmann, E.-R., Jannsen, S., Fink, E.,
Biophysik 4 (1968) 233
118. Leder, P., Nau, M.N., Proc. Nat. Acad. Sci. 58
(1967) 774
119. Leis, J.P., Keller, E.B., Biochem. Biophys. Res. Commun.
40 (1970) 416
120. Lisowska-Bernstein, B., Lamm, M.E., Vassalli, P.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 66 (1970) 425
121. Lucas, J.M., Schuurs, A.H.W.M., Simpson, M.V.,
Fed. Proc. 22 (1963) 302
122. Lucas, J.M., Schuurs, A.H.W.M., Simpson, M.V.,
Biochem. 3 (1964) 959
123. Lucas-Lenard, J., Lipmann, F., Proc. Nat. Acad. Sci.
55 (1966) 1562

124. Lucas-Lenard, J., Haenni, A.-L., Proc. Nat. Acad. Sci. 63 (1969) 93
125. Maeda, A., Imahori, K., Biochim. Biophys. Acta 76 (1963) 543
126. Marchant, R., Smith, D.G., Biol. Rev. 43 (1968) 459
127. Marcker, K., Sanger, F., J. Mol. Biol. 8 (1964) 835
128. Marcker, K., J. Mol. Biol. 14 (1965) 63
129. Marcus, A., Weeks, D.P., Leis, J.P., Keller, E.B., Proc. Nat. Acad. Sci. 67 (1970) 1681
130. Martin, T.E., Wool, I.G., J. Mol. Biol. 43 (1969) 151
131. Mazumder, R., Chae, Y.-B., Ochoa, S., Proc. Nat. Acad. Sci. 63 (1969) 98
132. McKeehan, W., Sepulveda, P., Lin, S.-Y., Hardesty, B., Biochem. Biophys. Res. Commun. 34 (1969) 668
133. Meselson, M., Stahl, F.W., Vinograd, J., Proc. Nat. Acad. Sci. 43 (1957) 581
134. Miller, D.L., Weissbach, H., Biochem. Biophys. Res. Commun. 38 (1970) 1016
135. Milman, G., Goldstein, J., Scolnick, E., Caskey, T., Proc. Nat. Acad. Sci. 63 (1969) 183
136. Morell, P., Marmur, J., Biochemistry 7 (1968) 1141
137. Morgan, R., J. Mol. Biol. 4 (1962) 115
138. Muto, A., J. Mol. Biol. 36 (1968) 1
139. Nakamoto, T., Kolakofsky, D., Proc. Nat. Acad. Sci. 52 (1966) 606
140. Nakamoto, T., Hamel, E., Proc. Nat. Acad. Sci. 59 (1968) 238
141. Naora, H., Biochim. Biophys. Acta 123 (1966) 151
142. Naora, H., Kodaira, K., Biochim. Biophys. Acta 123 (1966) 425
143. Neth, R., Monro, R.E., Heller, G., Battaner, E., Vazquez, D., FEBS Letters 6 (1970) 198
144. Nirenberg, M.W., Matthaei, J.H., Proc. Nat. Acad. Sci. 47 (1961) 1588

145. Nirenberg, M.W., Matthaei, J.H., Jones, O.W.,
Martin, R.G., Barondes, S.H., *Federat. Proc.* 22
(1963) 55
146. Nirenberg, M.W., Leder, P., *Science* 145 (1964) 1399
147. Nirenberg, M.W., Leder, P., Bernfield, M.,
Brimacombe, R., Trupin, J., Rottman, F., O'Neal, C.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 53 (1965) 1161
148. Nishizuka, Y., Lipmann, F., *Arch. Biochem. Biophys.*
116 (1966) 344
149. Nishizuka, Y., Lipmann, F., *Proc. Nat. Acad. Sci.*
55 (1966) 212
150. Nolan, R.D., Arnstein, H.R.V., *European J. Biochem.*
2 (1969) 445
151. Nolan, R.D., Arnstein, H.R.V., *European J. Biochem.*
10 (1969) 96
152. Nomura, M., Hall, B.D., Spiegelman, S., *J. Mol. Biol.*
2 (1960) 306
153. Nomura, M., Lowry, C.V., Guthrie, C., *Proc. Nat. Acad.*
Sci. 58 (1967) 1487
154. Ochoa, S., *Naturwiss. Rdsch.* 19 (1966) 483
155. Ochoa, S., *Naturw.* 55 (1968) 505
156. Olsnes, S., *FEBS Letters* 7 (1970) 211
157. Ono, Y., Skoultchi, A., Waterson, J., Lengyel, P.,
Nature 223 (1969) 697
158. Ottensmeyer, F.P., Whitmore, G.F., *J. Mol. Biol.*
38 (1968) 1
159. Parthier, B., Smuckler, E.A., Hultin, T.,
Biochim. Biophys. Acta 145 (1967) 446
160. Perani, A., Parisi, B., de Carli, L., Ciferri, O.,
Biochim. Biophys. Acta 161 (1968) 223
161. Perzyński, S., Chomczyński, P., Szafranski, P.,
Biochem. J. 114 (1969) 437
162. Pestka, S., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 61 (1968) 726
163. Pêtre, J., *European J. Biochem.* 14 (1970) 399
164. Piatigorsky, J., *Biochim. Biophys. Acta* 166 (1968) 142

165. Prichard, P.M., Gilbert, J.M., Shafritz, D.A., Anderson, W.F., *Nature* 226 (1970) 511
166. Pronczuk, A.W., Baliga, B.S., Munro, H.N., *Biochem. J.* 110 (1968) 783
167. RajBhandary, U.L., Kumar, A., *J. Mol. Biol.* 50 (1970) 707
168. Rao, P., Moldave, K., *J. Mol. Biol.* 46 (1969) 447
169. Rebond, J.-P., *C.R. Acad. Sci.* 286 (1969) 588
170. Reichert, U., *Diss. Math.-Naturw. Fak. Freie Univer. Berlin* 1969
171. Revel, M., Herzberg, M., Becarevic, A., Gros, F., *J. Mol. Biol.* 33 (1968) 231
172. Richter, D., Klink, F., *Biochem.* 6 (1967) 3569
173. Rieber, M., Imaeda, T., *Biochim. Biophys. Acta* 186 (1969) 173
174. Rock, G.D., Johnson, B.F., *Canad. J. Microbiol.* 16 (1970) 187
175. Sabol, S., Sillero, M.A.G., Iwasaki, K., Ochoa, S., *Nature* 228 (1970) 1269
176. Sala, F., Kuntzel, H., *European J. Biochem.* 15 (1970) 280
177. Sambrook, J.F., Fan, D.P., Brenner, S., *Nature* 214 (1967) 452
178. Schachman, H.K., *Ultracentrifugation in Biology*, Acad. Press, New York 1959
179. Schlessinger, D., Mangiarotti, G., Apirion, D., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 58 (1967) 1782
180. Schneider, J.A., Raeburn, S., Maxwell, E.S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33 (1968) 177
181. Schweiger, M., Herrlich, P., Zillig, W., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 350 (1969) 775
182. Scolnick, E., Tompkins, R., Caskey, T., Nirenberg, M., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 61 (1968) 768
183. Seeds, N.W., Retsema, J.A., Conway, T.W., *J. Mol. Biol.* 27 (1967) 421
184. Shahin, M., *Diss. Math.-Naturw. Fak. Freie Univer. Berlin* 1969

185. Shorey, R.L., Rael, J.M., Garner, C.W., Shive, W.,
J. Biol. Chem. 244 (1969) 455
186. Siddiqui, M.A.Q., Hosokawa, K., Biochem. Biophys. Res.
Commun. 32 (1968) 1
187. Skoultchi, A., Ono, Y., Moon, H.M., Lengyel, P.,
Proc. Nat. Acad. Sci. 60 (1968) 675
188. So, A.G., Davie, E.W., Biochemistry 2 (1963) 132
189. Spirin, A.S., Belitsina, N.V., Ajtkhozhin, M.A.,
J. Gen. Biol. 25 (1964) 321
190. Stav, L., Gross, P.R., Biochim. Biophys. Acta 182
(1969) 193
191. Subramanian, A.R., Ron, E.Z., Davis, B.D., Proc. Nat.
Acad. Sci. 61 (1968) 761
192. Svedberg, T., Pedersen, K.O., The Ultracentrifuge,
Verlag Steinkopff Dresden/Leipzig 1940
193. Swanson, R.F., Dawid, I.B., Proc. Nat. Acad. Sci. 66
(1970) 117 -
194. Takamori, Y., Lochmann, E.-R., Laskowski, W.,
Z. Naturforschg. 21b (1966) 960
195. Tamaoki, T., Miyazawa, F., Nakamura, K., Scrimger, J.W.,
Biochim. Biophys. Acta 157 (1968) 655
196. Tamaoki, T., Faber, A.J., Kato, T., Nature 221 (1969) 1050
197. Tissières, A., Watson, J.D., Schlessinger, D.,
Hollingworth, B.R., J. Mol. Biol. 1 (1959) 221
198. Tissières, A., Watson, J.D., Nature 182 (1958) 778
199. Träger, L., Einführung in die Molekularbiologie,
Gustav Fischer Verlag Stuttgart
200. Traub, P., Zillig, W., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.
343 (1966) 246
201. Traub, P., Zillig, W., Millette, R.L., Schweiger, M.,
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 343 (1966) 261
202. Traub, P., Nomura, M., J. Mol. Biol. 40 (1969) 391
203. Trupin, J., Dickerman, H., Nirenberg, M., Weissbach, H.,
Biochem. Biophys. Res. Commun. 24 (1966) 50

204. Vazquez, D., Biochim. Biophys. Acta 114 (1966) 277
205. Vazquez, D., Monro, R.E., Biochim. Biophys. Acta 142
(1967) 155
206. Wacker, A., Chandra, P., Beiträge Biochem. Physiol. v.
Naturstoffen (1965) 517
207. Walters, J.A.L.I., von Os, G.A.J., Biochim. Biophys.
Acta 199 (1970) 453
208. Watson, J.D., Crick, F.H.C., Cold Spring Harbor
Symp. quant. Biol. 18 (1953) 123
209. Watson, J.D., Crick, F.H.C., Nature 171 (1953) 964
210. Watson, J.D., Science 140 (1963) 17
211. Webb, J.N., Levy, M., J. Biol. Chem. 213 (1955) 107
212. Webb, J.N., J. Biol. Chem. 221 (1956) 635
213. Webster, G.C., J. Biol. Chem. 229 (1957) 535
214. Weinstein, I.B., Friedman, S.M., Ochoa, M., Jr.,
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31
(1966) 671
215. Weisberger, A., Wolfe, S., Federation Proc. 23
(1964) 976
216. Weisberger, A.S., Armentrout, S.A., Proc. Nat. Acad.
Sci. 56 (1966) 1612
217. Weisblum, B., Benzer, S., Holley, R.W., Proc. Nat.
Acad. Sci. 48 (1962) 1449
218. Weissbach, H., Redfield, B., Biochem. Biophys. Res.
Commun. 27 (1967) 7
219. Williams, A.K., Novelli, G.D., Bact. Proc. (1962),
(Abstr. Ann. Meeting American Soc. Microbiol.,
62 nd Ann. Meeting) p. 22
220. Williamson, R., Lanyon, G., Paul, J., Nature 223
(1969) 628
221. Wilson, D.B., Dintzis, H.M., Proc. Nat. Acad. Sci.
66 (1970) 1282
222. Yamamoto, O., Int. J. Radiat. Biol. 12 (1967) 467
223. Yanofsky, C., Carlton, B.C., Guest, J.R., Helinski, D.R.,
Henning, U., Proc. Nat. Acad. Sci. 51 (1964) 266

- 224. Yanyushin, B.F., Dunn, D.B., *Biochim. Biophys. Acta* 134 (1967) 91
- 225. Zachau, H.G., Acs, G., Lipmann, F., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44 (1958) 885
- 226. Zillig, W., Schachtschabel, D., Krone, W., *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 318 (1960) 100
- 227. Zubay, G., Lederman, M., *Proc. Nat. Acad. Sci.* 66 (1969) 550
- 228. Sylber, E.A., Penman, S., *Biochim. Biophys. Acta* 204 (1970) 221
- 229. Sylber, E.A., Penman, S., *Biochim. Biophys. Acta* 204 (1970) 230
- 230. *Methods in Enzymology III*, Acad. Press New York 1967

A N H A N G

Verzeichnis der Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
a-tRNS	Aminoacyl-tRNS
C	Curie
CTP	Cytidintriphosphat
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DNase	Desoxyribonuclease
DNS	Desoxyribonucleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
E. coli	Escherichia coli
FMet	N-Formylmethionin
g	Erdbeschleunigung
GDT	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
inakt. AS	Radioinaktive Aminosäuren
Ipm	Impulse pro Minute
Leu	L-Leucin
Merc	2-Mercaptoäthanol
Meth	L-Methionin
P _i	Anorganisches Phosphat
PEP	Kaliumphosphoenolpyruvat
PEP-Kinase	Phosphoenolpyruvat-Kinase
3-PG	3-Phosphoglycerinsäure
Phe	L-Phenylalanin
Poly A	Polyadenylsäure
Poly C	Polycytidylsäure
Poly U	Polyuridylsäure
POPOP	1,4-bis-2-(5-phenyloxazolyl)-benzen
PPO	2,5-diphenyloxazol
RNase	Ribonuclease
RNS	Ribonucleinsäure
mRNS	Messenger-Ribonucleinsäure
rRNS	Ribosomale Ribonucleinsäure

tRNS	Transfer-Ribonucleinsäure
S	Svedberg-Einheit
Sacch.	Saccharomyces Stamm 211
S 30	Überstand nach Ultrazentrifugation bei 30000 x g
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolette Licht
EF	Enzym-Fraktion
RF	Ribosomen-Fraktion

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Wintersemester 1968/69 bis zum Wintersemester 1970/71 im Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin angefertigt.

Herrn Prof. Dr. E.-R. Lochmann danke ich für die interessante Themenstellung, für die nützlichen Anregungen und für die umfangreiche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Zum Erfolg dieser Arbeit trug ein Aufenthalt im Institut für Biochemie der Max-Planck-Gesellschaft in München bei, der durch die freundliche finanzielle Unterstützung der European Molecular Biology Organization ermöglicht wurde. Für die dort gebotene Einführung in das Arbeitsgebiet und viele anregende Diskussionen sei Herrn Prof. Dr. W. Zillig und Herrn Dr. D. Rabussay gedankt.

Wertvolle Hinweise zur Abfassung der Arbeit hat Herr Prof. Dr. M. Schweiger gegeben, für die ich gerne Dank sage.

Mein besonderer Dank gilt Frau I. Pietsch, die durch gewissenhafte technische Assistenz zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Lebenslauf

Am 24. April 1937 wurde ich als erste Tochter des Stadtinspektors Hermann Senß und seiner Ehefrau Elfriede, geb. Wolf, in Berlin geboren.

Im Zuge der Evakuierung siedelten wir nach Klein-Behnitz im Havelland um. Hier wurde ich im April 1943 eingeschult. Seit Oktober 1947 besuchte ich die Droste-Hülshoff-Schule, Oberschule wissenschaftlichen Zweiges, in Berlin-Zehlendorf, die ich nach Abschluß der 10. Klasse im April 1953 verließ. Anschließend erhielt ich eine zweijährige Chemotechniker-Ausbildung in der Privaten Chemieschule von Dr. Lüders in Berlin-Lichterfelde.

In diesem Beruf war ich von Juni 1955 bis Oktober 1964 in verschiedenen Laboratorien tätig. Unter anderem gab ich zwei Jahre lang den Schülern der Privaten Chemieschule von Dr. Lüders Anleitungen im analytischen Praktikum und arbeitete von November 1959 bis Oktober 1964 als persönliche Assistentin von Prof. R.Brill im Fritz-Haber-Institut der Max-Planck-Gesellschaft.

Während dieser Zeit besuchte ich zweieinhalb Jahre die Peter-A.-Silbermann-Schule, das Berliner Abendgymnasium für Berufstätige, und legte hier im Mai 1964 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1964/65 begann ich mit dem Studium der Obst- und Gemüseverwertungs-Technologie an der Technischen Universität Berlin, wechselte jedoch nach zwei Semestern an die Freie Universität Berlin über, um mich dem Studium der Biologie zu widmen.

Die Diplom-Vorprüfung legte ich im November 1967 ab. Die Arbeit an der vorliegenden Dissertation begann ich im Wintersemester 1968/69 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. E.-R. Lochmann.

Seit 1.4.1969 bin ich als studentische Mitarbeiterin am Institut für Biophysik der Freien Universität Berlin angestellt.

Am 23.5.1969 schloß ich die Ehe mit dem Diplom-Chemiker Dr. Rüdiger Uttech.

